

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
TARTU ÜLIKOOLI TEHNOLOOGIAINSTITUUT
TARTU ÜLIKOOLI MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GEENITEHNOLOOGIA

Anastassia Lenskaja

Passiivse suitsetamise mõju astma kujunemisele väikelastel

Magistritöö, 30 EAP

Juhendajad: doktorant, Berit Pilden-Sarv, MSc

doktorant, Renata Melnikova, MD

vanemteadur Svetlana Sergejeva, MD, PhD

TARTU 2016

INFOLEHT

Passiivse suitsetamise mõju astma kujunemisele väikelastel

Käesolevas magistritöös käsitletakse passiivse suitsetamise mõju väikelastel hingamisteede haiguste tekkele astma näol. On teada, et passiivne suitsetamine soodustab astma teket, kuid selle täpsed mehhanismid on siiaeni teadmata. ALLERGOFOOD projektis kogutud andmete põhjal uuriti seost väikelastel passiivse suitsetamise ja astma tekkeriski vahel vere valgeliblede tasemel. Uuringus osalenud lastest koguni 34% oli eksponeeritud suitsule. Saadud tulemused näitasid, et astmaga ning tervetel antenataalselt tubakasuitsuga kokkupuutunud lastel kõrgenes monotsüütide arv ning see kasv ei olnud seotud pikenenud monotsüütide elulemusega. Teostatud *in vitro* eksperimentide tulemused kinnitasid antenataalse suitsetamise ja astma esinemise omavahelist seost. Saadud tulemused annavad alust oletada, et monotsüütidel võib olla oluline roll passiivse suitsetamise mõjust tingitud astma patogeneesi rajal.

CERCS teaduseriala: B540 Hingamissüsteemi haigused

Märksõnad: Astma, väikelaps, tubakasuits, antenataalne, monotsüüt

The effect of passive smoking on the manifestation of asthma in infants

The aim of this thesis was to analyze the effect of passive smoking on respiratory disorders such as asthma. It is well-known that passive smoking contributes to asthma development, but the exact mechanisms of this remain unknown. The relation between passive smoking and the development of asthma through white blood cells was studied using data from the ALLERGOFOOD project. Overall as much as 34% of the project participants were exposed to tobacco smoke. The results of this thesis show that children with asthma and children exposed to smoke antenatally had a higher monocyte count. However the growth in monocyte numbers was not an effect of the monocytes' prolonged survival. The connection between antenatal smoking and asthma was also supported by the results of the *in vitro* experiments. These results suggest that monocytes may play an important role in passive smoking-induced asthma pathogenesis.

CERCS research specialisation: B540 Respiratory diseases

Key words: Asthma, infant, tobacco smoke, antenatal, monocyte

Sisukord

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Astma	7
1.2 Passiivne suitsetamine	7
1.2.1 Antenataalse suitsetamise mõju lapse tervisele	8
1.2.2 Lapse passiivse suitsetamise koguse olulisus	9
1.2.3 Passiivse suitsetamise mõju seotud ajastusega	9
1.2.4 Ema ja isa suitsetamise poolt avaldava mõju võrdlus	10
1.3 Immuunsüsteem	11
1.3.1 Valgelibled	11
1.3.1.1 Neutrofiilid	12
1.3.1.2 Lümfotsüüdid	12
1.3.1.3 Monotsüüdid	13
1.3.1.4 Eosinofiilid	14
1.3.1.5 Basofiilid	14
1.3.2 Tsütokiinide tootmine	15
1.3.3 Erinevate valgeliblede seos astma patogeneesiga	16
1.3.4 Passiivse suitsetamise mõju immuunsüsteemile	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1 Töö eesmärgid	19
2.2 Materjal ja meetodika	20
2.2.1 ALLERGOFOOD projekti raames küsitluse läbiviimine ja vereproovide võtmine	20
2.2.2 Vere erütrotsüütide lüüsimine	21
2.2.3 Valgeliblede külmutamine	22
2.2.4 Verepreparaadi valmistamine ja lugemine	22
2.2.5 Vere rakude <i>in vitro</i> eksperimendid	22
2.2.5.1 Eeleksperiment sobivate stimulatsiooni kontsentratsioonide määramiseks	23
2.2.5.2 In vitro valgeliblede elulemuse eksperiment	24
2.2.6 Statistiline analüüs	25
2.3 Tulemused	26

2.3.1	ALLERGOFOOD projekt	26
2.3.2	Astma levimus ja haigestumus	26
2.3.3	Laste valgeliblede koosseis sõltuvalt astma esinemisest.....	27
2.3.4	Laste kokkupuude tubakasuitsuga	31
2.3.5	Laste valgeliblede diferentsiaalarvu sõltuvus suitsuga kokkupuutest	32
2.3.6	Valgeliblede elulemus peale stimulatsiooni	34
2.3.7	Erinevate valgeliblede alaklasside elulemus peale stimulatsiooni	35
2.4	Arutelu	38
KOKKUVÕTE		42
SUMMARY		44
TÄNUAVALDUSED.....		46
Kasutatud kirjandus		47
Kasutatud veebiaadressid.....		57
LISA 1		58
LIHTLITSENTS		70

KASUTATUD LÜHENDID

CSF – kolooniaid stimuleeriv faktor (*Colony Stimulating Factor*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*Dimethyl Sulfoxide*)

ECP – eosinofiilsete granulotsüütide katioonne proteiin (*Eosinophil Cationic Protein*)

EPO – eosinofiili peroksüdaas (*Eosinophil Peroxidase*)

ETS – keskkonna tubakasuits (*Environmental Tobacco Smoke*)

FBS – veisi loote seerum (*Fetal Bovine Serum*)

hCAP-18 – inimese katelitsidiin (*Human Cathelicidin Antimicrobial Protein*)

IFN – interferoon (*Interferoon*)

IgE – immunoglobuliin E (*Immunoglobulin E*)

IL – interleukiin (*Interleukin*)

LPS – lipopolüsahhariid (*Lipopolysaccharide*)

MBP – suur baasvalk (*Major Basic Protein*)

NGAL – neutrofiilide želatinaasiga seotud lipokaliin (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*)

NK-rakk – loomulik tapjarakk (*Natural Killer cell*)

PBS - fosfaatpuhver (*Phosphate-Buffered Saline*)

RSV – respiratoorne sünsütiaalne viirus (*Respiratory Syncytial Virus*)

Tc-rakk – tsütotoksiline-T-rakk (*T cytotoxic cell*)

Th-rakk – T-abistajarakk (*T helper cell*)

TLR – Tolli-sarnane retseptor (*Toll-like Receptor*)

TNF – kasvaja nekroosifaktor (*Tumor Necrosis Factor*)

WBC – valgelibled (*White Blood Cells*)

Sissejuhatus

Aktiivse suitsetamise kahjulikkus on teada juba ammu (Doll ja Hill, 1950). Tubakasuits sisaldab üle 5000 erineva komponendi (Talhout *et al.*, 2011), mille hulgas on erineva pikkusega alkaanid, alkeenid ja alküünid, mitmed aromaatsed süsivesinikud, steroolid, isoprenoidid, alkoholid, estrid, aldehüüdid, ketoonid, kinoonid, happed, fenoolid, aminohapped, valgud ja paljud muud keemilised ühendid (Stedman, 1967). 2012. aastal Euroopas olid 25% surmadest meeste hulgas ning 7% surmadest naiste hulgas tingitud aktiivse suitsetamise mõjust (Connelly, 2015). 85% kopsuvähist tingitud surmadest on põhjustatud suitsetamise poolt (Connelly, 2015). Eesti ja teised riigid võitlevad suitsetamise ning suitsu keskkonda sattumise vastu. Keskkonna tubakasuitsu (inglise keeles ETS – *Environmental Tobacco Smoke*) kahjulikkus inimese tervisele on teada alles XX sajandi lõpust. 1972. aastal ilmus esimene aruanne, mille autor J. Steinfeld käsitles passiivset suitsetamist ning 1975. aastal käivitusid esimesed uurimistööd, mis näitasid, et passiivne suitsetamine avaldab kahjulikku mõju mittesuitsetaja tervisele (Office on smoking and health (US), 2006). Viimaste kümnendite jooksul tehtud uuringud näitavad, et passiivne suitsetamine soodustab inimestel mitmete haiguste teket. Nende hulgas on sellised hingamisteede haigused nagu bronhiit ja astma. Täpsed mehhanismid, mille kaudu passiivne suitsetamine soodustab nende tervisehäirete teket on siiaeni aga ebaselged (Tebow *et al.*, 2008).

Tartu Ülikool viis läbi 2012 – 2015. aastal projekti nimega ALLERGOFOOD. Selles projektis osalesid 742 last vanuses 22-26 kuud. Antud lõputöö eesmärkideks oli välja selgitada ALLERGOFOOD projekti raames kogutud andmete põhjal, kas väikelapse passiivne suitsetamine mõjutab vere valgeliblede koosseisu ja elulemust ning soodustab alumiste hingamisteede haiguste nagu astma teket kahe esimese eluaasta jooksul. Käesolev lõputöö oli koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Astma

Astma on hingamisteede krooniline põletikuline haigus, millega kaasnevad õhuvoolu takistus, hingeldus, vilistav hingamine, köha ning pigistustunne rinnus (Bousquet *et al.*, 2000; Fireman, 2003; Bateman *et al.*, 2008). Maailma Terviseorganisatsiooni hinnangul on maailmas umbes 235 miljonit inimest, kellel on astma, mis moodustab ligikaudu 3% maailma populatsioonist. Astma on kõige sagedamini esinev krooniline haigus laste seas [1]. Astma puhul esinevat õhuvoolu takistust põhjustavad silelihaste kokkutõmbed, limaskesta turse ning bronhiõõntes esinev lima (Annus *et al.*, 2010). Maailma Terviseorganisatsiooni poolt tehtud meditsiini klassifikatsiooni järgi jagatakse astmat 4 alaklassiks: peamiselt allergiline (J45.0), mitteallergiline (J45.1), segatüüpi (J45.8) ning täpsustamata astma (J45.9) [2]. Astma diagnoosimine vajab komplektsset lähenemist, kuna pole ühtegi spetsiifilist diagnostilist meetodit ega markerit, mille abil saaks definitiivselt diagnoosi püstitada. Tavaliselt põhineb diagnoos tüüpiliste sümptomite olemasolul, millele lisanduvad vastavad läbivaatuse, uuringute ning ravitulemused. Täiskavanutel olulisemaks uuringuks diagnoosi püstitamisel on kopsufunktsiooni mõõdistamine. Selleks tehakse spiromeetriat, mille käigus hinnatakse sisse- ja väljahingatava õhu mahtu ja kiirust. Kuna spiromeetria teostamine nõuab patsiendilt head koostööd, kaasaarvatud kindlat hingamissagedust ja hingamissügavust, siis selline kopsufunktsiooni määramisviis ei sobi väikelastele. Seda enam, et enamikul astmaga lastest on spiromeetria tulemused normipiirides (Annus *et al.*, 2010). Seega on astma kindlakstegemine lastel vanuses kuni 2 aastat eriti keeruline. Väikelastel põhineb astma diagnoos tavaliselt sümptomite hinnangul, astma-spetsiifilise ravi tulemuslikkusel ning arsti kogemusel (Bateman *et al.*, 2008; Annus *et al.*, 2010).

Astma täpsed põhjused on siia maani teadmata, kuid on kindlaks tehtud, et astma avaldumist mõjutab nii geneetiline eelsoodumus kui ka teatud keskkonna mõjurid (Bateman *et al.*, 2008). Samuti teatud keskkonna tegurid soodustavad või vallandavad astma hoogude teket. Siia kuuluvad näiteks viirushaigused, allergeenid, kehaline koormus ja tubakasuitsuga kokkupuude (Fireman, 2003).

1.2 Passiivne suitsetamine

Keskkonna tubakasuits koosneb peamiselt ühenditest, mis eralduvad hõõguvast tubakast ja nimetatakse kõrvalsuitsuks (inglise keeles *side smoke*). Keskkonda satuvad samad suitsu keemilised komponendid,

mida suitsetaja hingab sisse, aga väiksemas kontsentratsioonis. Samal ajal sisaldab kõrvalsuits kõrgemas kontsentratsioonis vähki põhjustavaid ühendeid võrreldes suitsuga, mis satub suitsetaja organismi. Seega usutakse, et kõrvalsuits on mürgisem ja ohtlikum (Chan-Yeung ja Dimich-Ward, 2003; Schick ja Glantz, 2005).

Eestis, nagu ka teistes riikides, toimub aktiivne võitlus tubakatoodete tarbimise vastu. Oluliseks sammuks võitluse teel sai 04.05.2005 aastal vastu võetud tubakaseadus, mille järgi on avalikes kohtades suitsetamine keelatud [3]. 2012. aastal publitseeriti Sotsiaalministeeriumi toetusel tubakapoliitika roheline raamat, mille eesmärgiks on vähendada huvi suitsetamise vastu, piirata tubakatoodete kättesaadavust ning selle kaudu tagada suitsuvaba keskkond [4]. Rakendatav suitsetamise keeld avalikes kohtades kahjuks ei sunni inimesi suitsetamisest loobuma ega piira kodus suitsetamist. Kannatajateks on kodus elavad lapsed, kellest saavad tahtmatult passiivsed suitsetajad.

Väikelaste organism kannatab passiivse suitsetamise all eriti raskelt (Zhang *et al.*, 1999). Laste hingamissagedus on kiirem ja kehakaal on väiksem, mistõttu läheb vähem aega ja tubakasuitsu kogust, et mõjutada laste tervist. Lastel on kitsamad bronhid ja vähem välja arenenud immuunsüsteem, mille tagajärjel tekivad suitsuga kokkupuutel sageli just hingamisteede haigused (Cinar *et al.*, 2010). Selleks, et tõestada vanemate suitsetamise ohtlikkust lapse tervisele, on viimaste kümnendite jooksul läbi viidud mitmeid uurimistöid.

1.2.1 Antenataalse suitsetamise mõju lapse tervisele

Tehtud uuringud tõestavad, et lapse antenataalse passiivse suitsetamise ja hingamisteede haiguste tekkeriski vahel esineb tugev seos.

Mitmed uuringud on näidanud, et lapse hingamisteede haiguste teket soodustab ema aktiivne suitsetamine raseduse ajal (Gilliland *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004; Linneberg *et al.*, 2006; Håberg *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2010; Lapin *et al.*, 2015). Gilliland (2000) ja kolleegid leidsid, et ema suitsetamine raseduse ajal oli seotud langenud kopsufunktsiooniga lastel vanuses 10-16 aastat ning seda eriti väiksete hingamisteede funktsiooni arvelt. Lapse passiivne suitsetamine põhjustas samuti kopsufunktsiooni langust, kuid selle mõju lapse kopsufunktsioonile oli tunduvalt nõrgem võrreldes mõjuga, mida avaldas ema suitsetamine raseduse ajal (Gilliland *et al.*, 2000). Linneberg (2006) ja tema töökaaslased leidsid, et sage ehk igapäevane tulevase ema suitsetamine raseduse ajal soodustas lapsel vilistava hingamise teket. Murray (2004) koos töökaaslastega näitas, et vilistava hingamise tekkerisk oli suurem lastel, kelle ema suitsetas

kas ainult raseduse ajal, või nii raseduse ajal kui ka peale lapse sünni, võrreldes lastega, kelle kokkupuude ema suitsetamisega oli ainult postnataalne. Hilisem uuring näitas, et ema passiivne suitsetamine raseduse ajal isa suitsetamise näol ei avaldunud statistiliselt olulist mõju vilistava hingamise ega alumiste hingamisteede haiguste tekkeriskile (Håberg *et al.*, 2007).

1.2.2 Lapse passiivse suitsetamise koguse olulisus

Passiivse suitsetamise mõju lapse tervisele on seda suurem, mida suurema suitsu kogusega laps kokku puutub. Nii ema kui ka isa suitsetamise puhul esines positiivne korrelatsioon lapse hingamisteede haiguste tekkeriski ja suitsetatud sigarettide arvu vahel (Bråback *et al.*, 1995; Gergen *et al.*, 1998; Lister ja Jorm, 1998; Tsai *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012; Schwartsman *et al.*, 2013). Gergen (1998) ja tema kolleegid tuvastasid, et kodus rohkem kui 20 sigaretti päevas suitsetamine suurendas lapse astma, vilistava hingamise ning kroonilise bronhiidi tekkeriski. Lisaks näitasid Tsai (2010) koos töökaaslastega, et mida suurem oli peres aktiivsete suitsetajate arv, seda sagedamini esines perelastel astma, vilistav hingamine ning krooniline rögaeritus. Suurem suitsetajate arv tähendas suuremat suitsukogust, sest mitmete suitsetajate puhul toimus nende suitsetamise poolt avaldava mõju koostoime. Nii mõjutab nii ema kui ka isa suitsetamine koos lapse astma tekkeriski tugevamalt võrreldes eraldi ema või isa suitsetamise mõjuga (Tsai *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012). Lisaks leiti ka positiivne seos lapse kotiniini (nikotiini metaboliit uriinis, mida kasutatakse suitsuga kokkupuute tuvastamiseks) taseme ning vilistava hingamise esinemise sageduse vahel (Murray *et al.*, 2004; Schwartsman *et al.*, 2013).

1.2.3 Passiivse suitsetamise mõju seotud ajastusega

Passiivse suitsetamise poolt avaldav efekt sõltub sellest, mis vanuses oli laps suitsule eksponeeritud. Uuringus lastega vanuses kuni 1 eluaastat leiti, et ema suitsetamine lapse imikueas suurendas lapse hingamisteede haiguste tekkeriski rohkem võrreldes lastega vanuses 3-10 aastat (Bråback *et al.*, 1995; Gergen *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2012). Gergen (1998) koos töökaaslastega näitasid, et lastel vanuses 2 kuud kuni 2 aastat oli passiivne suitsetamine seotud astma, kroonilise bronhiidi ja vilistava hingamise tekkega. Samas lastel vanuses 3 kuni 5 aastat oli vanemate suitsetamine seotud ainult astma tekkeriskiga (Gergen *et al.*, 1998). Murray (2012) koos kolleegidega leidsid, et ema suitsetamine soodustas lapse vilistava hingamise teket esimesel eluaastal, kuid ei olnud seotud vilistava hingamise tekkega kolmeaastastel lastel. Mitchell (2012) ja tema kolleegid näitasid, et ema suitsetamine

lapse esimese eluaasta jooksul mõjus 6-7-aastase lapse astma tekkeriskile rohkem võrreldes ema suitsetamisega lapse 6-7 eluaastal.

1.2.4 Ema ja isa suitsetamise poolt avaldava mõju võrdlus

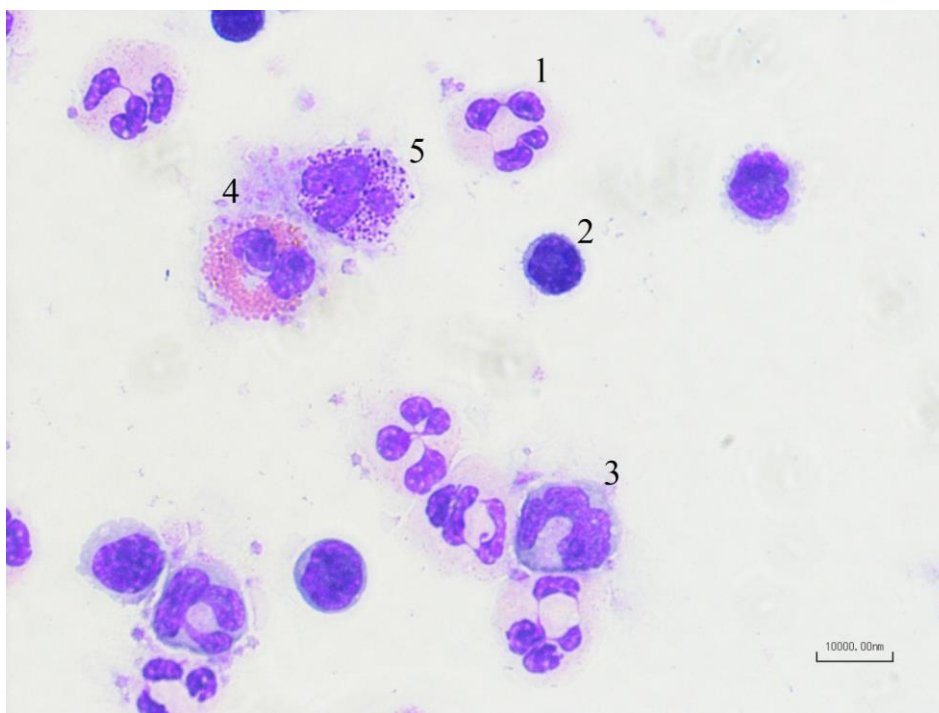
Kui vaadati ema ja isa suitsetamist peale lapse sünni eraldi leiti, et võrreldes isaga avaldas ema suitsetamine suuremat mõju nii imikute kui ka 13-14-aastaste laste vilistava hingamise ja astma tekkeriskile. Ema suitsetamine peale lapse sünni mõjus lapse hingamisteede tervisele rohkem isegi siis, kui ema suitsetas koguseliselt väiksema arvu sigarette (Tsai *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012; Schvartsman *et al.*, 2013). Ema suitsetamine avaldas lapse hingamisteede tervisele suuremat mõju, kuna tavaliselt on ema lapsega rohkem aega koos. Lister ja Jorm (1998) leidsid positiivse seose ema poolt suitsetatud sigarettide arvu ning lapse astma ja astmaga seotud vilistava hingamise tekkeriski vahel. Samas isa suitsetamine ei avaldunud statistiliselt olulist mõju lapse hingamisteede tervisele (Lister ja Jorm, 1998). Teistes uuringutes tuvastati, et esines positiivne lineaarne korrelatsioon just ema, aga mitte isa, lapse sünnijärgse suitsetamise ning lastel köha tekkimise vahel (Murray *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2010). Sarnast tulemust näidati ka Eesti laste seas (Bråback *et al.*, 1995). Siiski suurendas isa suitsetamine peale lapse sünni lapse vilistava hingamise tekkeriski lapse esimese kahe eluaasta jooksul, aga ainult siis, kui isa oli ainuke suitsetaja peres (Håberg *et al.*, 2007; Schvartsman *et al.*, 2013).

Kirjanduse andmetel soodustab passiivne suitsetamine lastel hingamisteede haiguste teket. Lapseea astma ja selle sümptomite teket mõjutab kõige rohkem ema suitsetamine raseduse ajal. Peale lapse sünni avaldab ema suitsetamine lapse hingamisteede tervisele rohkem mõju võrreldes isa suitsetamisega. Ema ja isa samaaegne suitsetamine mõjutab laste hingamisteede haiguste teket kõige tugevamalt. Siit avalduv mõju on seda suurem, mida suurema suitsukogusega laps puutub kokku. Seega esineb tugev korrelatsioon vanemate poolt suitsetatud sigarettide koguse ja lapse hingamisteede haiguste tekkeriski vahel. Samal ajal avaldatud uuringutele tuginedes nõrgeneb passiivse suitsetamise mõju lapse tervisele lapse kasvamisega ning seega on passiivne suitsetamine eriti ohtlik lapse esimeste eluaastate jooksul.

1.3 Immuunsüsteem

1.3.1 Valgelibled

Valgelibled ehk leukotsüüdid (inglise keeles WBC – *White Blood Cells*) on immuunsüsteemi rakud, mis osalevad organismi kaitses patogeenide ja patoloogiliseks muutunud rakkude vastu. Nende peamiseks ülesandeks on patogeenide tuvastamine ning hävitamine kas otseselt või antikehade moodustamise teel. Oma funktsioone suudavad leukotsüüdid teostada nii kehavedelikes kui ka kudedes, kuhu nad migreeruvad läbi veresoonte seinte (Stewart *et al.*, 1974). Nimetus *White Blood Cell* (WBC) ehk valgeverelib, tuleneb sellest, et nad on värvusetud ning tsentrifuugimisel moodustavad valge kihi punaliblede ja vereplasma vahel. Ka kreeka keeles nimi „leukotsüüt“ tähendab *λευκο* – valge ja *κύτταρο* – rakk. Kõik valgelibled pärinevad luuüdis leiduvast tüvirakust, mille nimeks on hematopoeetiline tüvirakk (Dexter *et al.*, 1979). Hematopoeesi käigus sündinud rakud jagunevad viieks alaklassiks (Joonis 1). Need alaklassid erinevad teineteisest suhtelise suuruse, leviku, tuuma suuruse ja kuju, tsütoplasmas graanulite olemasolu, graanulite värvumise omaduste ning raku funktsiooni poolest (Saladin, 2012).



Joonis 1. Foto vere valgeliblede tsütospinnist. Tähistused: 1 – neutrofiil, 2 – lümfotsüüt, 3 – monotsüüt, 4 – eosinofiil, 5 – basofiil. Pilt oli tehtud valgusmikroskoobi abil suurendusega 1000x peale May-Grünwald-Giemsa värvimist.

Kõik valgelibled sisaldavad tsütoplasmas lüsoosome ehk ebaspetsiifilisi asurofiilseid graanuleid, mis sisaldavad peroksüdaase, hüdrolaase ja mitmeid valke (Bretz ja Baggiolini, 1974). Neutrofiilid, eosinofiilid ja basofiilid sisaldavad tsütoplasmas ka spetsiifilisi graanuleid, mille tõttu neid nimetatakse granulotsüütideks (Saladin, 2012). Spetsiifiliste graanulite sees on erinevad bioloogiliselt aktiivsed ained, mille abil rakud suudavad võidelda patogeenide vastu. Monotsüüdid ja leukotsüüdid on agranulotsüüdid, ehk nendel puuduvad spetsiifilised graanulid (Saladin, 2012).

1.3.1.1 Neutrofiilid

Neutrofiilid on kõige arvukamalt esindatud valgelibled moodustades 60-70% tsirkuleerivatest leukotsüütidest (Saladin, 2012). Verepreparaadil on rakkude diameeter 12-15 µm. Rakutuuma kuju järgi jagunevad neutrofiilid kaheks tüübiks: segmenteeritud ning kepptuumsed. Küpse raku tuum on segmenteeritud, mille tõttu kuuluvad neutrofiilid polümorfonukleaarsete leukotsüütide hulka. Nimi „neutrofiil“ tuleneb sellest, et pH7 juures May-Grünwald-Giemsa värvingul värvuvad nad nii happelise (eosiini) kui ka aluselise (metüleensinise ja asuuri) värviga (Saladin, 2012). Tsütoplasmas leiduvad peroksüdaas-negatiivsed graanulid, mida jagatakse sekundaarseteks ning tertsiaarseteks graanuliteks (Kjeldsen *et al.*, 1992). Sekundaarsed ehk spetsiifilised graanulid sisaldavad antibiootilise toimega valke nagu laktoferriin (Masson *et al.*, 1969), inimese katelitsidiin (inglise keeles hCAP-18 – *Human Cathelicidin Antimicrobial Protein*; Cowland *et al.*, 1995) ja neutrofiilide želatinaasiga seotud lipokaliin (inglise keeles NGAL – *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*; Kjeldsen *et al.*, 1993). Need valgud transporditakse fagosoomi sisse või rakust välja (Joiner *et al.*, 1989). Tertsiaarsed graanulid sisaldavad aga matriitsi-degradeerivaid ensüüme nagu želatinaas (Kjeldsen *et al.*, 1992; Mollinedo *et al.*, 1997), heparanaas (Mollinedo *et al.*, 1997) ja leukolüsiin, mis osalevad neutrofiilide tungimisel läbi veresoone seina ehk ekstravasatsioonis (Kang *et al.*, 2001). Neutrofiilidel on aga lühike eluiga (kuni 3 päeva), sest nad ei suuda lüsosoomi uuendada ja surevad peale patogeenide fagotsütoosi (Young *et al.*, 2011). Neutrofiilide põhiülesandeks on mikroorganismide fagotsütoos ning rakuvälise püüdevõrgustiku moodustamine (Brinkmann *et al.*, 2004).

1.3.1.2 Lümfotsüüdid

Lümfotsüüdid on agranulotsüüdid, mida leidub suuremas mahus lümfivedelikus, kust pärineb ka nende nimi. Lümfotsüüdid moodustavad 25-33% kõikidest valgelibledest, samas on nad kõige väiksemad

leukotsüüdid diameetriga 5-17 μm (Saladin, 2012). Lümfotsüütidel on suur tuum, mis May-Grünwald-Giemsa värviga värvub tumesiniseks. Lümfotsüüdid jagunevad kolmeks suureks grupiks: T-lümfotsüüdid, B-lümfotsüüdid ning loomulikud tapjarakud – NK-rakud (inglise keeles NK cells - *Natural Killer cells*). Lümfotsüüdid osalevad nii kaasasündinud kui ka adaptiivses immuunsuses.

- B-lümfotsüüdid osalevad omandatud immuunsuse töös. Inimestel valmivad nende eellased luuüdis. B-rakkude peamine ülesanne on antikehade tootmine ning immuunsüsteemi mälu tagamine (Burnet *et al.*, 1957; Jacob *et al.*, 1991).
- T-lümfotsüüdi nimi tuli sõnast „tüümus“, kus toimub nende rakkude küpsemine (Miller ja Osoba, 1967; Janeway *et al.*, 2001). Rakud jagunevad omakorda veel paljudeks alaklassideks. Järgmisena on toodud 3 peamist alaklassi:
 - tsütotoksilised-T-rakud – Tc-rakud (inglise keeles Tc-cells – *T cytotoxic cells*), mis põhjustavad patogeeni või vähiraku apoptoosi. Selleks toodavad nad toksilisi graanuleid, mis sisaldavad perforiini (Masson ja Tschopp, 1985) ja gransüümi (Krähenbühl *et al.*, 1988);
 - T-abistajarakud – Th-rakud (inglise keeles Th-cells – *T helper cells*), mille ülesanne on tsütokiinide tootmine ning teiste immuunrakkude reguleerimine (Alberts *et al.*, 2002);
 - Supressor-T-rakud, mis osalevad teiste immuunrakkude aktiivsuse regulatsioonis ning immuunvastuse mahasurumises (Shevach, 2001).
- NK-rakud ehk loomulikud tapjarakud on kõige suuremad lümfotsüüdid, mis osalevad kaasasündinud immuunsuses. Nende peamiseks ülesandeks on vähirakkude ning viirustega nakatunud rakkude lüüsimine (Kiesling *et al.*, 1975; Mandelboim *et al.*, 2001).

1.3.1.3 Monotsüüdid

Monotsüüdid on kõige suuremad leukotsüüdid rakudiameetriga 18-20 μm . Nende osakaal on 3-8% leukotsüütidest (Saladin, 2012). Rakkudel on oa-kujuline tuum. Monotsüütide peamiseks ülesandeks on tsütokiinide tootmine ja fagotsütoos. Samas suudavad monotsüüdid surnud patogeeni osakesi teistele immuunrakkudele esitada (Randolph *et al.*, 2008; Cros *et al.*, 2010). Kuna monotsüütide ülesanded ei piirdu patogeenide surmamisega, siis on nende eluiga palju pikem kui neutrofiilidel. Pärast paar päeva veres viibimist migreeruvad monotsüüdid kudedesse, kus muutuvad makrofaagideks (van Furth ja Cohn, 1968). Makrofaagid osalevad surnud rakkude kõrvaldamises ning mikroorganismide fagotsütoosis (Geissmann *et al.*, 2010).

1.3.1.4 Eosinofiilid

Eosinofiilide osakaal veres on ainult 2-4% kõikidest valgelibledest (Saladin, 2012). Eosinofiilid on diameetriga 12-17 µm. Nende tuum on segmenteeritud. Eosinofiilid said oma nime eosiinist, punasest happelisest värvist, mida kasutatakse värvimiseks May-Grünwald-Giemsa meetodil. Eosinofiile saab tuvastada tänu suurtele graanulitele, mis värvuvad eosiiniga oranž-punakaks. Need graanulid sisaldavad valke nagu eosinofiili peroksüdaasi (inglise keeles EPO – *Eosinophil Peroxidase*), eosinofiilsete granulotsüütide katioonset proteiini (inglise keeles ECP – *Eosinophil Cationic Protein*) ning suurt baasvalku (inglise keeles MBP – *Major Basic Protein*). MBP suudab hävitada endoparasiite (Hamann *et al.*, 1990; Specht *et al.*, 2006) ning baktereid (Lehrer *et al.*, 1989). ECP kuulub RNAas A perekonda ning osaleb endoparasiitide (McLaren *et al.*, 1981; Hamann *et al.*, 1987), bakterite (Rosenberg, 1995), ssRNA viiruste (Domachowske *et al.*, 1998) ja peremees-kudede hävitamises (Motojima *et al.*, 1989). EPO suudab tappa parasiite ning temal on nii põletikuvastane (Henderson *et al.*, 1982) kui ka põletikku soodustav aktiivsus (Henderson *et al.*, 1980). Eosinofiili ülesanneteks on väikeste rakkude ja osakeste fagotsütoos ning suurte parasiitide hävitamine (Saladin, 2012).

1.3.1.5 Basofiilid

Basofiilid on kõige haruldasemad leukotsüüdid (0,5-1% valgelibletest) (Saladin, 2012). Rakutuum on segmenteeritud, tsütoplasmas on suured graanulid. May-Grünwald-Giemsa värvimisega muutuvad nad tumesinisteks. Graanulid värvuvad aluseliste värvidega, millest tuleneb ka nende nimetus (inglise keeles *basic* – aluseline). Basofiilide graanulid sisaldavad histamiini ja hepariini (Saladin, 2012). Histamiin laiendab veresooni ja kiirendab verevoolu kahjustatud kudedesse (Akerman *et al.*, 2002). Hepariin takistab vere hüübimist ja selle kaudu tagab valgeliblede liikuvust (Zmuda *et al.*, 2000). Basofiilid eritavad neutrofiile ja eosinofiile meelitavaid aineid (Saladin, 2012). Lisaks osalevad nad parasiitide hävitamises graanulitest vabastatud ainetega. Degranuleerimine ja histamiini vabastamine toimuvad kahel viisil: IgE-vahendatud või komplemendi süsteemi aktivatsiooni kaudu, mis on palju kiirem viis. Komplemendi C5 peptiidid põhjustavad nii histamiini vabastamist basofiilide rakkudest kui ka basofiilide degranuleerimist juba 15 sekundit peale stimuleerimist (Dvorak *et al.*, 1981). Bakterite rakumembraani lipopolüsahhariidid kutsuvad esile histamiini vabastamist basofiilidest komplemendi süsteemi kaudu (Norn *et al.*, 1986). IgE vahendatud mehhanismi käivitavad allergeenid, mis seonduvad basofiilide pinnal asetsevatele retseptoritele ning põhjustavad histamiini vabastamist (Valent, 1994; Mukai *et al.*, 2005). Antud mehhanism on allergiale iseloomulike nähtude põhjuseks.

1.3.2 Tsütokiinide tootmine

Tsütokiinid on peptiidid, mis osalevad immuunsüsteemi signaalide ülekandes ning reguleerivad immuunsust, põletikku ja hematopoeesi (Cluitmans *et al.*, 1997). Sõna „tsütokiin“ tuli kreeka keelest ja koosneb sõnadest *κύτταρο* – rakk ja *κίνηση* – liikumine. Tsütokiinide nimed tulevad nii avastamisjärjekorrast kui ka päritolust, struktuurist või funktsioonist. Kõige tuntumad tsütokiinide klassid on interleukiinid (inglise keeles IL - *Interleukin*), interferoonid (inglise keeles IFN - *Interferon*), kasvaja nekroosifaktorid (inglise keeles TNF – *Tumor Necrosis Factor*), kolooniaid stimuleerivad faktorid (inglise keeles CSF – *Colony Stimulating Factor*) ning kemokiinid (inglise keeles *Chemokines*). Käesolevas töös edasi mainitud tsütokiinide omadused on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös edasi mainitud tsütokiinide omadused (modifitseeritud Khan, 2008).

Tsütokiin	Päritolu	Sihtmärk	Funktsioon
IL-4	Th-rakud, NK-rakud	T-rakud, B-rakud, makrofaagid	Proliferatsioon, isotüübi üleminek (inglise keeles <i>isotype switching</i>), MHC klass II ekspressiooni induktsioon
IL-5	Th-rakud,	Eosinofiilid	Proliferatsioon ja diferentseerumine
IL-9	Th-rakud	Th-rakud, eosinofiilid	Põletikulise vastuse induktsioon
IL-13	Th-rakud	B-rakud, makrofaagid	Põletikuliste tsütokiinide inhibitsioon, põletiku regulatsioon
IFN α	Valgelibled	Makrofaagid, NK-rakud, T-rakud	Viiruse replikatsiooni inhibitsioon
IFN γ	Th1-rakud, NK-rakud, Tc-rakud	Makrofaagid, NK-rakud, T-rakud	Viiruse replikatsiooni inhibitsioon, rakkude proliferatsiooni inhibitsioon, IL-4 toime inhibitsioon

1.3.3 Erinevate valgeliblede seos astma patogeneesiga

Astma sümptomid on eelkõige tingitud hingamisteede läbitavuse takistusest, mille peamiseks põhjuseks on haigetes hingamisteedes esinev põletik, ning sellega kaasnev erinevate WBC arvu kõrgenemine veres (Bousquet *et al.*, 1990; Hoekstra *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2001; Karakoc *et al.*, 2002; Machura *et al.*, 2010; Akelma *et al.*, 2015). Lewis (2001) ja tema töökaaslased näitasid, et astmaga täiskasvanutel oli kõrgenenud eosinofiilide, neutrofiilide ja basofiilide arv. Samal ajal ei leitud mingit seost astma ja monotsüütide ning lümfotsüütide arvu vahel, kuid monotsüütide arv oli madalam noorematel astmaga täiskasvanutel võrreldes vanemate astmaga täiskasvanutega (Lewis *et al.*, 2001). Bousquet (1990) koos töökaaslastega leidis, et astmaga täiskasvanutel oli eosinofiilide arv kõrgem võrreldes tervete täiskasvanutega. Kuueaastastel astmaga lastel oli nii üld-valgeliblede kui ka eosinofiilide arv kõrgem võrreldes tervete lastega (Akelma *et al.*, 2015). Eosinofiilide arvu kasvu 1-14-aastastel astmaga lastel näidati paljudes uurimistöodes (Hoekstra *et al.*, 1996; Karakoc *et al.*, 2002; Machura *et al.*, 2010) ning selle üheks mehhanismiks on tõestatud eosinofiilide pikenenud elulemus (Burke *et al.*, 1991). Burke (1991) ja tema töökaaslased näitasid, et eosinofiilide elulemust kõrgendasid monotsüütide ja lümfotsüütide poolt eraldatud faktorid, nagu näiteks CSF (kolooniaid stimuleeriv faktor). Astmahaigete hingamisteedes toimub samuti eosinofiilide, lümfotsüütide ja makrofaagide arvu kõrgenemine (Gant *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1992; Bradding *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 2005).

Tavaliselt põhjustavad viiruslikud infektsioonid väikelastel astmat ja astmaga seotud sümptomite teket. Rinoviirus ja respiratoorne sünsütiaalne viirus (inglise keeles RSV – *Respiratory Syncytial Virus*) on kõige levinumad astma ägenemiste põhjustajad lastel (Mitchell *et al.*, 1976). Tovey (2014) koos töökaaslastega näitas, et ninaneelus leiduv rinoviirus oli seotud kõrgendatud astma sümptomite tekkeriskiga 8-aastastel lastel. Eggo (2016) ja tema kolleegid leidsid, et koolilastel oli astma ägenemine seotud viiruslike nakkustega. Viiruslikud nakkused põhjustavad interferoonide vabastamist, mis häirivad viiruse replikatsiooni erinevate mehhanismide kaudu (Guo *et al.*, 2004). Astmahaigetel aga ei suuda immuunsüsteemi rakud viirustega kokkupuutel interferoone toota. Samal ajal leiti, et valgeliblede langenud interferoonide vabastamise tase oli seotud väikelastel astma sümptomite ägenemisega (Isaacs *et al.*, 1981; Copenhaver *et al.*, 2004; Gern *et al.*, 2006). Durrani (2012) koos tema töökaaslastega näitas, et IgE retseptorite arvu tõus 10-12-aastastel astmaga lastel oli seotud langenud IFN α vabastamisega tasemega. Bufe (2002) ja tema kolleegid näitasid, et IFN α tootmine oli positiivselt seotud 3-9-aastaste laste veres kõrgenenud eosinofiilide arvuga. Samal ajal IFN γ vabastamine ei olnud langenud (Bufe *et al.*, 2002). Teises uuringus aga leiti, et langenud IFN γ tootmine oli seotud üheaastastel lastel vilistava hingamise tekkeriskiga (Guerra *et al.*, 2004). Contoli (2015) ja tema töökaaslased pakkusid, et IFN γ vabastamise häiret põhjustas IL-4 ja IL-13 tootmine. Samuti on astmahaigete hingamisteed sageli

koloniseeritud *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ja *S. pneumoniae* bakteritega. Larsen (2014) koos töökaaslastega näitas, et gramnegatiivsed bakterid (*H. Influenzae* ja *M. catarrhalis*) põhjustasid valgeliblede immuunvastuse häiret. Valgelibled hakkasid tootma IL-5 ja IL-13 suuremas kontsentratsioonis, samal ajal kui IFN γ vabastamise tase oli langenud (Larsen *et al.*, 2014). Bisgaard (2010) ja tema töökaaslased näitasid, et *H. influenzae* ja *M. catarrhalis* infektsioonid olid seotud vilistava hingamise tekkega lastel vanuses 1-2 eluaastat. Karta (2014) koos kolleegidega leidis, et gramnegatiivsete bakterite infektsiooni puhul langes täiskasvanutel immuunsüsteemi vastus rinoviiruse infektsioonile. Teises uuringus näidati, et rinoviiruse poolt käivitatud astma ägeneimise korral oli võimalik suurema tõenäosusega tuvastada *M. catarrhalis* ja *S. pneumoniae* tüvesid 4-12-aastaste laste hingamisteedes (Kloepfer *et al.*, 2014).

1.3.4 Passiivse suitsetamise mõju immuunsüsteemile

Passiivse suitsetamise mõjul toimub lapse veres valgeliblede arvu suurenemine (Ronchetti *et al.*, 1990; El-Nawawy *et al.*, 1996; Vinke *et al.*, 1999). El-Nawawy (1996) ja tema töökaaslased näitasid oma uurimistöös, et nii üldine leukotsüütide arv kui ka eosinofiilide arv oli suurenenud kümneaastastel lastel, kelle vanemad suitsetasid mistahes lapse eluhetkel võrreldes mitte-suitsetajate lastega. Samas uuringus leiti, et suitsetajate lastel sõltus valgeliblede arv lapse hingamisteede haiguste sagedusest. Lastel, kellel esinesid sagedased vilistava hingamise episoodid, ülemiste ja alumiste hingamisteede infektsioonid, või keskkõrva põletik, toimus üldine valgeliblede ning eosinofiilide arvu kasv, võrreldes nende suitsetajate lastega, kes ei haigestunud nõnda sageli. Lisaks korreleerus üldine valgeliblede arv IgE kontsentratsiooniga vereseerumis, mis omakorda sõltus suitsetatud sigarettide arvust (El-Nawawy *et al.*, 1996). Vinke (1999) koos tema töökaaslastega leidis, et suitsuga kokkupuutel kasvas neljaaastastel lastel granulotsüütide, eriti eosinofiilide, arv veres. Samal ajal ninaneelus T-abistajarakkude ja makrofaagide arv ei erinenud suitsetajate ja mitesuitsetajate peres kasvavate laste vahel (Vinke *et al.*, 1999). Ronchetti (1990) ja tema kolleegid uurisid lapsi vanuses 9 aastat. Just poiste hulgas toimus statistiliselt oluline eosinofiilide arvu kasv ja IgE kontsentratsiooni tõus suitsetajate peres võrreldes mitesuitsetajatega (Ronchetti *et al.*, 1990). Lisaks näitasid autorid, et mida suurema koguse suitsuga laps kokku puutus, seda enam kasvas tema eosinofiilide arv (Ronchetti *et al.*, 1990). Kui peres suitsetas ainult üks vanem, oli lapse eosinofiilide arv 5 korda suurem võrreldes lastega, kelle vanemad ei suitsetanud üldse. Samas kahe suitsetajaga pere lastel oli eosinofiilide arv 9 korda suurem kui suitsuga mitte kokkupuutuvatel lastel. Eosinofiilide arv laste veres oli seda kõrgem, mida suurem oli suitsetatud sigarettide arv (Ronchetti *et al.*, 1990).

Passiivne suitsetamine mõjutab ka valgeliblede tsütokiinide tootmist (El-Nawawy *et al.*, 1990; Noakes *et al.*, 2003; Feleszko *et al.*, 2006; Tebow *et al.*, 2008; Linnamaa *et al.*, 2012). Noakes (2003) koos töökaaslastega uuris rasedaid naisi, jagades neid kaheks grupiks sõltuvalt sellest, kas nad suitsetasid raseduse ajal või mitte. Uurimistöö käigus analüüsiti laste nabaväädivere mononukleaarsed rakke, stimuleerides neid allergeeni või mitogeeni (Noakes *et al.*, 2003). Tulemused näitasid, et lastel, kelle ema suitsetas raseduse ajal hakkasid nabaväädivere mononukleaarsed rakud peale allergeenide ning mitogeenidega stimuleerimise tootma IL-13 suuremas kontsentratsioonis, võrreldes lastega, kelle ema ei suitsetanud raseduse ajal. IL-5 ning IL-9 produktsioon lapse nabaväädiveres peale stimuleerimise oli samuti suurenenud juhul, kui ema suitsetas raseduse ajal. Samas leiti antud uuringus, et lastel, kelle ema suitsetas raseduse ajal, toimus IFN γ alaproduktsioon (Noakes *et al.*, 2003). Feleszko (2006) ja tema kolleegid uurisid oma teadustöös seost allergilise astma, passiivse suitsetamise ja ninaneelu rakkudes tsütokiinide tootmise võime vahel. Nad näitasid, et 6-16-aastastel lastel allergilise astma puhul ninaneelu aspiraadi rakkudes toimus samuti IL-13 tootmise kasv ning IFN γ tootmise mahasurumine sõltumata suitsuga kokkupuutest (Feleszko *et al.*, 2006). Astmaga lastel, kes viibisid suitsuga ruumides ning kelle vanemad suitsetasid rohkem kui 10 sigaretti päevas, oli IL-13 kontsentratsioon kõrgem kui astmaga lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku. Samuti autorid leidsid, et astmahaigetel korreleerus IL-13 ja IL-5 kontsentratsioon ninaneelu aspiraadis IgE kontsentratsiooniga vereseerumis. Samal ajal kui IFN γ puhul oli seos IgE kontsentratsiooniga pöördvõrdeline (Feleszko *et al.*, 2006). El-Nawawy (1996) ja tema töökaaslased näitasid sarnast tulemust ja leidsid, et 10-aastaste laste IL-4 kontsentratsioon korreleerus IgE kontsentratsiooniga ja suurenes vanemate suitsetamise toimet. Linnamaa (2012) ja tema kolleegid näitasid aga, et vanemate suitsetamine põhjustas üheaastastel lastel peale valgeliblede stimulatsiooni konkanavaliini A'ga nii IFN γ kui ka IL-4 ja IL-5 tsütokiinide kontsentratsioonide tõusu võrreldes lastega, kelle vanemad ei suitsetanud (Linnamaa *et al.*, 2012). Tebow (2008) koos oma töökaaslastega leidis, et 11-aastastel lastel, kelle vanemad suitsetasid mistahes lapse eluhetkel, toimus peale perifeerse vere valgeliblede stimulatsiooni konkanavaliini A ning forbool-12-müristaat-13-atsetaadiga IFN γ kontsetratsiooni langus. Samal ajal aga ei toimunud mingit muutust IL-4 tootmises (Tebow *et al.*, 2008).

Kokkuvõtteks: passiivne suitsetamine põhjustab valgeliblede ning eriti eosinofiilide arvu suurenemist. Rakud hakkavad rohkem tootma ja/või eritama järgmiseid tsütokiine: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. IL-4 ja IL-13, kusjuures tsütokiinide tootmise ja eritamise kasvu näidatakse ka astmahaigete veres. Samal ajal toimub astma haigetel IFN γ alaproduktsioon. Interferoonid osalevad immuunvastuses viiruslike nakkuste korral ning seega passiivse suitsetamise toimet langeb lastel valgeliblede võime viiruste vastu võidelda. Interferoonide tootmise mahasurumist leiti ka astmahaigetel. Leitud sarnased muutused passiivsetel suitsetajatel ja astmahaigetel annavad alust oletada, et passiivne suitsetamine suudab põhjustada astma teket läbi vererakkude koosseisu muutuse ja kasvanud tundlikkusele viirushaigustele.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärkideks on:

- a) iseloomustada seost lapse ja loote passiivse suitsetamise ja astma tekkeriski vahel kaheaastaste laste seas ALLERGOFOOD projekti andmete põhjal;
- b) uurida laste vereproovide valgeliblede koosseisu erinevust vastavalt astma ja/või suitsuga kokkupuute olemasolule;
- c) analüüsida laste erinevate valgeliblede elulemuse muutust peale *in vitro* rakkude stimuleerimist bakteriaalse lipopolüsahhariidi ja viirusliku dsRNA molekulidega.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 ALLERGOFOOD projekti raames küsitluse läbiviimine ja vereproovide võtmine

ALLERGOFOOD projekt sai alguse 2012. aastal. Peale Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt loa saamist, päriti EV Siseministeeriumi Rahvastiku toimingute osakonnast Eesti rahvastikuregistri andmeid Tartumaal 01.02.2011 – 31.12.2013 ajavahemikus sündinud ning hetkel Eestis elavate laste kohta. 22-24 elukuu vanuseks saanud laste ema ja isa elektroonilisele aadressile saadeti uuringus osalemise kutse ning küsimustiku lühendatud ja täisvariant elektroonilises vormis (**LISA 1**). Antud kirja koopia saadeti meeldetuletuseks veel kord vanemate elektroonilisele aadressile ühe nädala möödumisel. Kahe nädala pärast saadeti lapse vanemate kodusele aadressile kutse ja küsimustikud paberkandjal. Osalemisest loobumiseks täitsid vanemad lühiküsimustiku, teatades loobumise põhjusest ning allergia esinemise võimalikkusest lapsel ja peres. Need vanemad, kes olid nõus uuringus osalema, täitsid täisküsimustiku ja tulid arsti vastuvõtule. Uringuarst esitas lisaküsimused peres esineva allergia, lapse allergia, lapse arengu ja varem põetud haiguste kohta, tegi lapsele arstliku läbivaatluse, nahatorketestid ning võttis vereproovi. Vereproov transporditi laborisse ning käideldi koheselt.

Lapse tubakasuitsuga kokkupuute järeldused olid tehtud vanemate poolt täidetud küsimustiku põhjal. Positiivne vastus küsimusele „Kas laps viibib või on viibinud ruumides, kus esineb tubakasuitsu?“ (**LISA 1**, Küsimus 85) kinnitas lapse postnataalset suitsuga kokkupuudet. Lapse antenataalne tubakasuitsule ekspositsioon oli määratletud kui ema suitsetas või viibis tubakasuitsuga ruumides raseduse ajal, ehk jaatavad vastused küsimustele: „Kas ema suitsetas raseduse ajal?“ (**LISA 1**, Küsimus 80) või „Kas raseduse ajal viibisite ruumides, kus esines tubakasuitsu?“ (**LISA 1**, Küsimus 82).

Astma oli määratletud kui vanemad vastasid jaatavalt küsimusele: „Kas Teie lapsel on diagnoositud astmat?“ ja uuringu arst kinnitas diagnoosi ning ka juhul, kui vanemad vastasid sellele küsimusele eitavalt, kuid uuringu arst püstitas astma diagnoosi lapsele esmakordselt. Küsimus „Kas see oli diagnoositud viimase 12 kuu jooksul?“ oli võetud arvesse, et määrata lapse vanus astma diagnoosi püstitamise ajal. Kontrollgruppi võeti atoopiaavabad lapsed (defineeritud kui kõikide uuringu ajal või varem tehtud nahatorketestide ja allergeeni spetsiifiliste IgE mõõtmisega positiivse tulemuse puudumine), kellel ei ole kunagi esinenud astmat ega astmale viitavaid sümptomeid (näiteks vilistavat hingamist) või varasemalt põetud alumiste hingamisteede haigust (bronhiiti, bronhioliiti või kopsupõletikku), allergilist haigust ega selle kahtlust (k.a. negatiivne vastus küsimusele, „Kas Teie lapsele on kunagi tehtud allergia teste?“, mis viitaks teistel arstidel tekkinud allergilise haiguse kahtlust). Samuti polnud alust kahtlustada

mäkimisväärsed enneaegsust (raseduse kestus alla 37 nädalat) ning elustamisega (k.a. Apgar'i skoor alla 7 või lisahapniku vajadus) või muul põhjusel tekkinud hingamisteede kahjustust.

Edasiseks võrdlemiseks tehti astmaga lastele 4 jaotust:

- Astma fenotüübi järgi: terved (kontrollgrupp), allergiline, mitteallergiline ning segatüüpi astma. Kuna ainult 1 laps oli isoleeritud allergilise astmaga, siis see grupp ühendati segatüüpi astma grupiga;
- Kasutatud ravimite järgi: terved, astma ravita ja ainult bronhodilataatorid ning mistahes baasravi, kuhu kuuluvad inhaleeritav steroid ja/või montelukast;
- Sensibiliseerumise ehk allergeenide suhtes tundlikkuse esinemise järgi: terved, astma sensibilisatsioonita ning astma kaasneva sensibilisatsiooniga. Eraldi võeti ka astmat sensibilisatsiooniga ainult sissehingatavate allergeenide vastu, kuhu kuuluvad kodutolmulest, koduloomad, õietolmud ja hallitus;
- Kaasuva allergilise haiguse esinemise järgi: terved, astma ilma kaasuva haiguseta ning astma koos mistahes allergilise haigusega (atoopiline dermatiit, nõgestõbi, allergiline nohu ja/või anafülaaktiline reaktsioon).

Suitsetamise mõju analüüsiks jagati lapsed 6 grupiks sõltuvalt astma olemasolust ning tubakasuitsuga kokkupuutest: astmaga ja terved lapsed, kes ei puutunud tubakasuitsuga kokku, astmaga ja terved lapsed, kellel esines postnataalne tubakasuitsuga kokkupuude, astmaga ja terved lapsed, kellel esines antenataalne tubakasuitsuga kokkupuude.

2.2.2 Vere erütrotsüütide lüüsimine

Vererakkude eraldamiseks tsentrifuugiti verd (2500 rpm; 10 min; 4°C). Eraldati pealmist vereplasmat ja säiliti seda -20°C juures edasiseks analüüsiks. 4 ml vere erütrotsüütide lüüsimiseks võeti 27 ml destilleeritud vett, mida lisati vererakkudele ning segati 25 sekundit. Vee osmootse rõhu toimele erütrotsüüdid lõhustuvad ning alles jäävad ainult vere valgelibled (McCarthy ja Macey, 2001). Lüüsi peatamiseks lisati 3 ml 10x fosfaatpuhvrit (inglise keeles PBS - *Phosphate-Buffered Saline*). Peale reaktsiooni peatumist täideti katsuti PBS-iga lõppmahuni 50 ml ning tsentrifuugiti (1400 rpm; 10 min; 4°C). Peale supernatandi eemaldamist rakud resuspendeeriti 1 ml PBS-i lahuses. Rakkude lugemiseks valmistati segu Trypan Blue värviga (*Sigma Aldrich*, USA). Peale seda loendati rakud hemotsütoomeetri (1 A ruudu ruumala 0,1 mm³) abil mikroskoobi all 400x suurendusel.

2.2.3 Valgeliblede külmutamine

Valgeliblede külmutatamiseks valmistati külmutussegu. Selleks segati kokku 60% DMEM söödet (sisaldas glükoosi, naatrium püruvaati ja L-glutamiini, *Naxo*, Eestimaa), 20% veise loote seerumit (inglise keeles FBS – *Fetal Bovine Serum*) (*Sigma-Aldrich* USA) ja 20% dimetüülsulfoksiidi (inglise keeles DMSO – *Dimethyl Sulfoxide*) (*Sigma-Aldrich*, USA). Külmutussegule lisati 1:1 suhtes rakususpensiooni lõppmahuga 1 ml ja tihedusega 10×10^6 rakku/ml. DMSO imendumiseks rakkudesse hoiti valmistatud segu 30 min jää peal. Seejärel asetati krüoviaalid *CoolCell* (*BioCision*, USA) mahutis -86°C sügavkülma ning hoiti seal üleöö. *CoolCell* mahutis alanes rakusegu temperatuur kontrollitud kiirusega $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Peale selle säilitati krüoviaalid vedela lämmastiku hoidlas edasiseks kasutamiseks.

2.2.4 Verepreparaadi valmistamine ja lugemine

Tsütospinni klaaside valmistamiseks kasutati tsütotsentrifuugi (*Thermo Scientific*, USA) järgides tootjapoolset protokollit. Igale tsütospinnile pipeteeriti 50 000 rakku ning tsentrifugeeriti (1500 rpm; 5 min). Enne värvimist slaidid kuivatati.

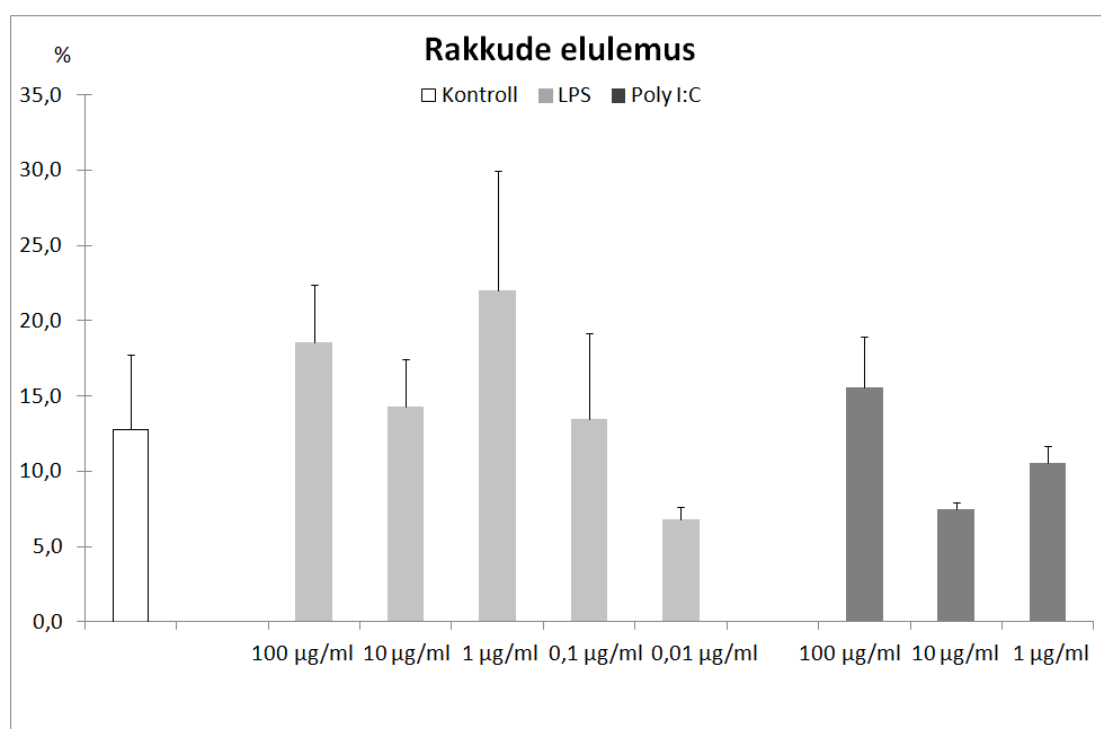
Verepreparaadi värvimiseks kasutati May-Grünwald-Giemsa meetodit. Alusklaasid värviti May-Grünwald segus 10 minutit. Segu sisaldas 86 ml May-Grünwald värvi (*Sigma Aldrich*, USA) ja 22 ml metanooli. Peale klaaside 3 kordset pesemist destilleeritud vees värviti klaasid Giemsa segus 15 minutit. 10 ml Giemsa värvile (*Sigma Aldrich*, USA) lisati 110 ml destilleeritud vett. Klaase pesti 3 korda destilleeritud vees ning kuivatati üleöö. Kuivatatud alusklaasidele asetati katteklaasid kasutades liimi (*Deltalab*, Hispaania). Kokku loendati mikroskoobis 500 rakku immersioonõli ja 1000x suurendusega.

2.2.5 Vere rakude *in vitro* eksperimentid

Vererakkude *in vitro* stimuleerimiseks kasutati *Pseudomonas aeruginosa* lipopolüsahhariidi (inglise keeles LPS – *Lipopolysaccharide*; *Sigma Aldrich*, USA) ning kunstlikult sünteesitud kaksikahelalisi RNA molekule (*Poly I:C*; *InvivoGen*, USA). LPS on gramnegatiivsete bakterite rakumembraani komponent, mis seondub immuunsüsteemi rakkudega läbi TLR-retseptor 4 (inglise keeles TLR – *Toll-Like Receptor*) (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). *Poly I:C* on kunstlikult sünteesitud kaheaahelaline RNA molekul, mida tuvastatakse läbi TLR-retseptor 3 (Alexopoulou *et al.*, 2001).

2.2.5.1 Eeleksperiment sobivate stimulatsiooni kontsentratsioonide määramiseks

Valmistati stimulatsiooni lahused: 1 mg/ml kontsentratsiooniga LPS lahus DMEM söötmes ning 2 mg/ml kontsentratsiooniga *Poly I:C* lahus füsioloogilises vees (*InvivoGen*, USA). Sobivate kontsentratsioonide valimiseks tehti eeleksperiment. Eeleksperimentis kasutati lammastikus külmutatud vabatahtliku patsiendi vere valgeliblesid. Rakkude sulatamine, tsentrifuugimine ja istutamine olid teostatud vastavalt punktis 2.2.5.2 kirjeldatule. Peale istutamist olid LPS kontsentratsioonid saadud lahustes (lõppkontsentratsioonid) vastavalt 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml. *Poly I:C* lõppkontsentratsioonid istutamise segudes olid vastavalt 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml (Noakes *et al.*, 2006; Sykes *et al.*, 2013). Rakkude elulemuse kontrolli teostati 24 tundi peale inkubatsiooni alustamist (Noakes *et al.*, 2006; Sykes *et al.*, 2013). Eeleksperimenti tulemused on toodud diagrammil (Joonis 2). Korraldatud eeleksperimentide tulemuste põhjal otsustati, et kõige sobivamad lõppkontsentratsioonid on kõige parema elulemuse taganud LPS stimulatsioon kontsentratsiooniga 1 µg/ml ja *Poly I:C* kontsentratsiooniga 100 µg/ml.



Joonis 2. Rakude elulemuse eksperimenti tulemused. Eksperiment oli korraldatud 2 korda ning iga stimulatsioon oli tehtud 3. paralleelis. Toodud andmed on esitatud keskmiste väärtustena + standardhälve.

2.2.5.2 *In vitro* valgeliblede elulemuse eksperiment

In vitro valgeliblede elulemuse eksperimentiks valiti 4 laste rühma:

- terved lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku (5 last);
- terved lapsed, kes puutusid suitsuga kokku antenataalselt (5 last);
- astmaga lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku (5 last);
- astmaga lapsed, kes puutusid suitsuga kokku antenataalselt (5 last).

Lämmastikus külmutatud 1ml rakususpensiooni sulati 2 minuti jooksul 37°C juures ning segati 13 ml eelnevalt 37°C juures soojendatud 1% penitsilliini-streptomütsiini lisandiga DMEM söötmes. Saadud lahust tsentrifuugiti (600 rpm; 10 min; 37°C). Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant ja resuspendeeriti rakud 0,5 ml eelnevalt 37°C juures soojendatud söötmes (DMEM, 10% inimese seerumit (*Sigma Aldrich*, USA) 1% penitsilliini-streptomütsiini lisandiga (*Sigma Aldrich*, USA)). Saadud lahusest segati 1:1 Trypan Blue värviga ning loendati elus ja surnud rakud hemotsütomeetri abil mikroskoobi all. Rakud istutati 96 kannuga plaadile. Igasse kannu istutati 50 000 elusat rakku. Istutamiseks kasutatud segud on tootud tabelis 2.

Tabel 2. Laste vererakkude istutamiseks kasutatud segud.

	Rakusegu	Stimulatsioon	Sööde ¹	Lõppmaht
0 stimulatsioon	180 µl	-	20 µl	200 µl
LPS	180 µl	20 µl	-	200 µl
Polü I:C	180 µl	10 µl	10 µl	200 µl

1. Sööde sisaldas DMEM, 10% inimese seerumit, 1% penitsilliini-streptomütsiini segu

Istutamisest ülejäänud rakususpensioonist tehti tsütospinn. Istutatud rakud inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures niiskes 5% CO₂ keskkonnas. Peale inkubatsiooni võeti igast istutatud kannust 150 µl supernatanti ning külmutati -20°C juures edasiseks analüüsiks. Ülejäänud 50 µl rakususpensioonist võeti 15 µl, segati 15 µl Trypan Blue värviga ning loendati elus ja surnud rakud hemotsütomeetriga mikroskoobi all. Istutamiskaani kannud loputati 2 korda 200 µl PBS-iga kogu rakumaterjali kogumiseks. Rakumaterjalile lisati PBS-i kuni 1,5 ml mahuni ning tsentrifuugiti (600 rpm; 5 min). Peale supernatandi eemaldamist lisati rakkudele vajalik kogus PBS-i vastavalt loendatud rakkude arvule. Saadud lahustest tehti tsütospinnid eespool kirjeldatud meetodi järgi.

2.2.6 Statistiline analüüs

Saadud andmete statistiline analüüs oli teostatud kasutades „R“ ja „Statview“ tarkvara. Astma esinemissageduse võrdlemiseks sõltuvalt suitsuga kokkupuute kogusest kasutati hii-ruut ja Fisher teste. Statistiliselt olulise erinevuse valgelibele diferentsiaalrõhk astma ja suitsuga kokkupuute gruppide kaupa leidmiseks rakendati Kruskal-Wallis ja Mann-Whitney teste. Mann-Whitney testi kasutati kahe grupi keskmiste väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks. Kruskal-Wallis testi rakendati rohkem kui kahe grupi korraga võrdlemiseks. Erinevus oli statistiliselt oluline kui p-väärtus oli vähem kui 0,05. Kõik tulemused on esitatud keskmiste väärtustena koos standardhälbega.

2.3 Tulemused

Käesolevas magistritöös analüüsiti ALLERGOFOOD projektis osalenud laste valgeliblede koosseisu ning võrreldi valgeliblede diferentsiaalarvu erinevust astmaga ja tervetel lastel. Lisaks vaadati valgeliblede alaklasside elulemuse muutust peale rakkude stimuleerimist bakteriaalse lipopolüsahhariidi ja viirusliku dsRNA molekulidega.

2.3.1 ALLERGOFOOD projekt

ALLERGOFOOD projekti raames saadeti 2979 kutset uuringus osalemiseks. Loobumisankeedi täitis 497 inimest. Peamine põhjus uuringust loobumiseks oli arvamus, et uuringus ettenähtud protseduurid on lapse jaoks liiga koormavad (54%). Sageduselt teised põhjused jaotusid järgmiselt: 31% vanematest loobus osalemisest selleks vajaliku aja puuduse tõttu, 18% loobus uuringus osalemisest huvi puuduse tõttu ning neli protsenti vanematest leidis, et laps on niigi ülekoormatud meditsiiniliste protseduuride poolt. Oma nõusoleku projektis osalemiseks andis 767 inimest (26%). Nendest 755 inimest täitis küsimustiku ja visiidile tuli 742 inimest. Visiitide käigus teostati nahatorketestid kokku 734. lapsele ning võeti 675 vereproovi. Uuringus osalenud laste ja nende vanemate demograafilised tunnused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Uuringus osalenud laste ja nende vanemate demograafilised tunnused

Uuringus osalenud laste sugu	370 poissi (50%), 372 tüdrukut (50%)
Laste ema keskmine vanus uuringus osalemisel	31,74 aastat vana
Laste isa keskmine vanus uuringus osalemisel	34,58 aastat vana
Laste ema rahvus	667 eestlast (90%), 66 venelast (9%), teised (1%)
Laste isa rahvus	662 eestlast (89%), 51 venelast (7%), teised (4%)

2.3.2 Astma levimus ja haigestumus

Astma levimus Tartumaal elavate laste seas erines üheaastaste ja kaheaastaste laste vahel. 742. visiidile tulnud lapsest 40. oli varasemalt diagnoositud astma. Lisaks püstitas uuringuarst kolmel lapsel, kellel ei olnud varem astma diagnoosi, haiguse diagnoosi põhinedes vanemate poolt esitatud kaebustel, varem põetud haigustel ja arstlikul läbivaatusel. Astma esinemissagedus Eestimaa üheaastaste ja kaheaastaste laste seas on vastavalt kaks ja 6 %. Samuti erines astma haigestumus ehk aasta jooksul diagnoositud astma juhtumite levimus üheaastaste ja kaheaastaste laste vahel. Esimesel eluaastal oli astma diagnoositud

14. juhul, mis tähendab, et 10 000 üheaastase lapse kohta esineb kaks astma juhtumit. Kaheaastaste laste seas oli astma diagnoositud 29. lapsel teise eluaasta jooksul. Nendest kolmele lastele pandi diagnoos ALLERGOFOOD'i uuringu käigus. Kaheaastaste laste seas esines astmat neljal juhul 10 000 lapse kohta.

Astma alaklassidest enamikel lastest, ehk 86%, esines mitteallergiline astma. Segatüüpi astma esines 12% lastest ning puhas allergiline astma leiti vaid ühel lapsel. Umbes pooltel astma diagnoosiga lastest kaasnes lisaks astmale muu allergiline haigus: atoopiline dermatiit 20. lapsel, nõgestõbi 8. lapsel, allergiline nohu neljal ning anafülaktiline reaktsioon ühel. Umbes veerandil astmaga lastest esines atoopia, ehk sensibilisatsioon erinevate allergeenide suhtes: 5% oli sensibiliseeritud õietolmu (kase, timuti ja puju), 11% kassi, 9% koera ja 5% kodutolmulesta suhtes. Rohkem kui kolme erineva sissehingatava allergeeni suhtes oli sensibiliseeritud 5% astmaga lastest. Astma baasravi oli määratud 91% astmaga lastest, milleks enamikel (79%) lastel oli raviks määratud inhaleeritav glükokortikosteroid, 10% montelukast monoterapiana ning 10% montelukast kombinatsioonis inhaleeritava glükokortikosteroidiga. Kolm last neljast, kes ei saanud baasravi, olid esmaselt diagnoositud juhtumid, kellel baasravi oli alustatud hiljem, ehk peale uuringus osalemist.

2.3.3 Laste valgeliblede koosseis sõltuvalt astma esinemisest

Astmaga lastel oli vere valgeliblede koosseis sarnane tervete lastega. Neutrofiilide, lümfotsüütide, monotsüütide, eosinofiilide ja basofiilide absoluut- ja suhtarvud ning valgeliblede üldarv olid samuti sarnased astmaga ja tervetel lastel (Tabel 4, Tabel 5).

Tabel 4. Valgeliblede suhtarvud astma gruppide kaupa

Grupid	PMN	Lf	Mo	Eos	Bas
Terved lapsed	52±1	32±1	9±0,3	6±0,4	0,3±0,03
Astmaga lapsed	50±2	32±2	10±0,5	9±1	0,2±0,05
Astma fenotüübi järgi jaotatult					
Mitteallergilise astmaga lapsed	49±2	32±2	10±0,5	8±1	0,2±0,05
Allergilise ja segatüüpi astmaga lapsed	53±5	30±4	10±2	6±1	0,2±0,2
Kasutatud ravimite järgi jaotatult					
Ravita ja/või bronhodilataatoritega ravitud astmaga lapsed	48±6	32±6	11±1	9±2	0,3±0,07
Montelukastiga ravitud astmaga lapsed	44±2	35±2	11±0,8	9±4	0,7±0,4
Inhaleeritavate steroididega ravitud astmaga lapsed	50±2	32±2	10±0,6	8±1	0,2±0,05
Montelukasti ja inhaleeritavate steroididega ravitud astmaga lapsed	49±5	31±6	10±2	11±3	0,2±0,2
Sensibilisatsiooni olemasolu järgi jaotatult					
Sensibilisatsioonita astmaga lapsed	48±2	33±2	10±0,5	9±1	0,2±0,06
Sensibilisatsiooniga astmaga lapsed	54±3	29±3	10±1	6±0,8	0,2±0,1
Astmaga ja sissehingataavatele allergeenidele sensibilisatsioonita lapsed	49±2	33±2	10±0,5	9±1	0,2±0,06
Astmaga ja sissehingataavatele allergeenidele sensibilisatsiooniga lapsed	55±5	29±4	10±2	6±1	0,2±0,1
Kaasuva allergilise haiguse esinemise järgi jaotatult					
Astmaga ilma kaasuva allergilise haiguseta lapsed	48±3	34±3	11±0,7	7±1	0,3±0,07
Astmaga koos kaasuva haigusega lapsed	52±2	30±2	9±0,6	9±2	0,2±0,08

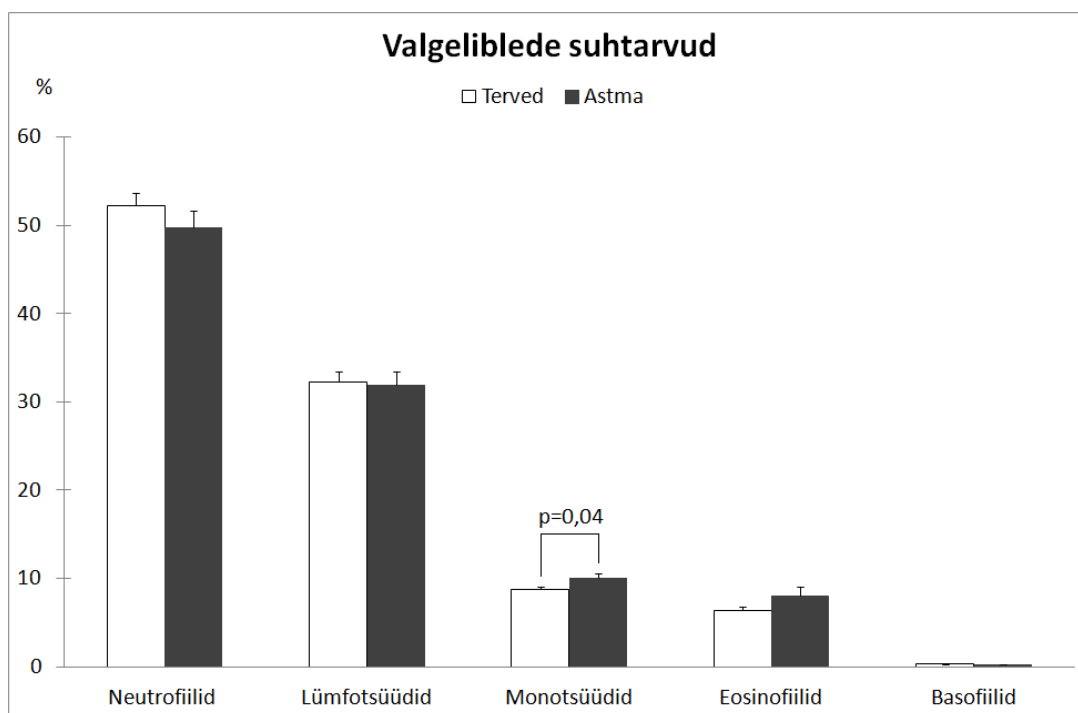
Arvud on esitatud: keskmine arv ± standardhälve. Lühendid: PMN – neutrofiil; Lf – lümfotsüüt; Mo – monotsüüt; Eos – eosinofiil; Bas – basofiil.

Tabel 5. Valgeliblede alaklasside absoluutarvud ja üldarv (rakku $\times 10^6$) astma gruppide kaupa

Grupid	PMN	Lf	Mo	Eos	Bas	Valgeliblede üldarv
Terved lapsed	2,9 \pm 0,2	1,7 \pm 0,08	0,5 \pm 0,02	0,3 \pm 0,03	0,02 \pm 0,002	5,4 \pm 0,2
Astmaga lapsed	2,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,05	0,4 \pm 0,05	0,01 \pm 0,003	5,6 \pm 0,4
Astma fenotüübi järgi jaotatult						
Mitteallergilise astmaga lapsed	2,7 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	0,5 \pm 0,05	0,4 \pm 0,06	0,01 \pm 0,003	5,4 \pm 0,4
Allergilise ja segatüüpi astmaga lapsed	3,1 \pm 0,6	2,0 \pm 0,6	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,05	0,01 \pm 0,009	6,2 \pm 1,2
Kasutatud ravimite järgi jaotatult						
Ravita ja/või bronhodilataatoritega ravitud astmaga lapsed	3,7 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,03 \pm 0,008	7,7 \pm 1,2
Montelukastiga ravitud astmaga lapsed	2,4 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	0,6 \pm 0,03	0,6 \pm 0,3	0,04 \pm 0,02	5,5 \pm 0,6
Steroididega ravitud astmaga lapsed	2,8 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,07	0,4 \pm 0,05	0,01 \pm 0,003	5,5 \pm 0,5
Montelukasti ja steroididega ravitud astmaga lapsed	2,0 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,07	0,01 \pm 0,009	4,1 \pm 0,7
Sensibilisatsiooni olemasolu järgi jaotatult						
Sensibilisatsioonita astmaga lapsed	2,6 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	0,5 \pm 0,05	0,4 \pm 0,06	0,01 \pm 0,004	5,4 \pm 0,4
Sensibilisatsiooniga astmaga lapsed	3,2 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,3 \pm 0,04	0,01 \pm 0,006	5,9 \pm 0,8
Astmaga ja sissehingataavatele allergeenidele sensibilisatsioonita lapsed	2,6 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	0,5 \pm 0,05	0,4 \pm 0,06	0,01 \pm 0,004	5,4 \pm 0,4
Astmaga ja sissehingataavatele allergeenidele sensibilisatsiooniga lapsed	3,4 \pm 0,5	1,9 \pm 0,5	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,04	0,01 \pm 0,008	6,4 \pm 1,0
Kaasuva allergilise haiguse esinemise järgi jaotatult						
Astmaga ilma kaasuva allergilise haiguseta lapsed	2,8 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	0,7 \pm 0,09	0,4 \pm 0,05	0,02 \pm 0,004	5,8 \pm 0,5
Asmaga koos kaasuva haigusega lapsed	2,7 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2	0,5 \pm 0,06	0,4 \pm 0,08	0,01 \pm 0,005	5,3 \pm 0,6

Arvud on esitatud: keskmine arv \pm standardhälve. Lühendid: PMN – neutrofiil; Lf – lümfotsüüt; Mo – monotsüüt; Eos – eosinofiil; Bas – basofiil.

Ainus rakutüüp, mis erines statistiliselt oluliselt gruppide vahel ning oli kõrgem astmaga lastel võrreldes tervete lastega, oli monotsüüt (Joonis 3).



Joonis 3. Valgeliblede suhtarvud (keskmine + standardhälve).

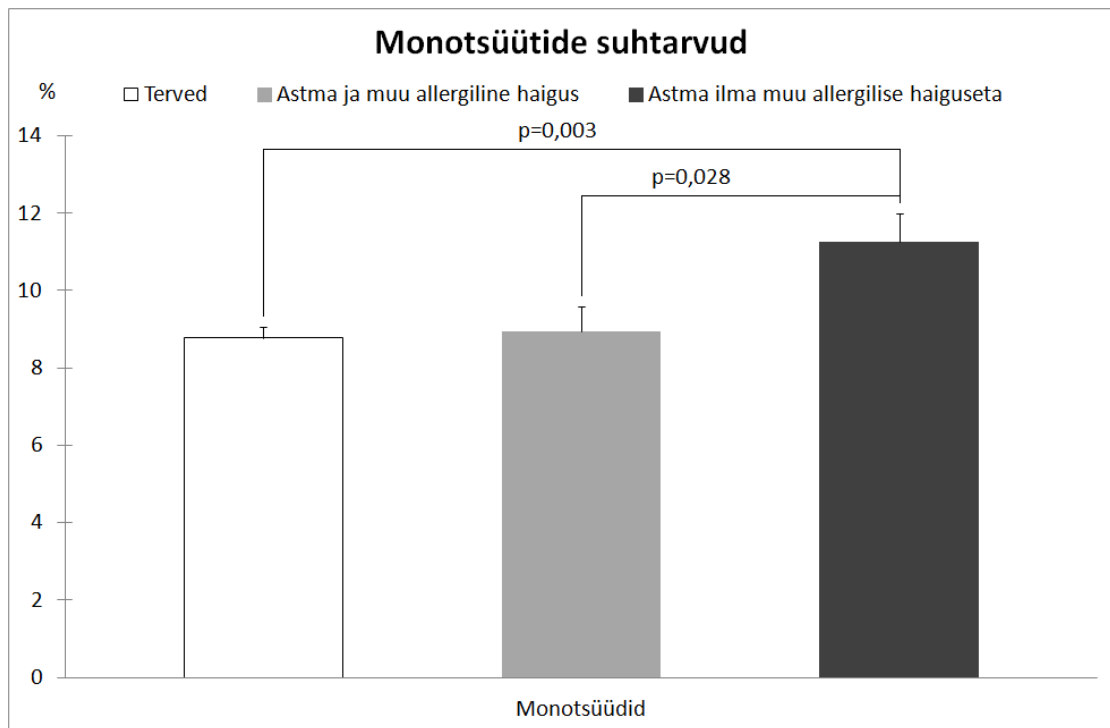
Monotsüütide suhtarv oli astmaga lastel statistiliselt oluliselt kõrgem kui tervetel lastel ($10 \pm 0,5$ vs. $9 \pm 0,3\%$, $p=0,04$). Eosinofiilide suhtarv oli keskmiselt kõrgem astmaga patsinetidel, kuid ei ulatunud statistiliselt olulise erinevuseeni (8 ± 1 vs. $6 \pm 0,4\%$, $p=0,067$).

Vaadates erinevaid astma alaklasse ei leidunud mingit statistiliselt olulist erinevust mistahes gruppide vahel. Neutrofiilide, lümfotsüütide, monotsüütide, eosinofiilide ja basofiilide absoluut- ja suhtarvud mitteallergilise (J45.1) ning ühendatud allergilise ja segatüüpi (J45.0 ja J45.8) astmaga lastel on toodud tabelites (Tabel 4, Tabel 5).

Võrreldi omavahel astma gruppe sõltuvalt ravist ning ka siin ei leidnud mingit statistiliselt olulist erinevust. Neutrofiilide, lümfotsüütide, monotsüütide, eosinofiilide ja basofiilide absoluut- ja suhtarvud ning valgeliblede üldarv on toodud tabelites (Tabel 4, Tabel 5).

Sensibilisatsiooni olemasolu ei mõjuta statistiliselt oluliselt valgeliblede koosseisu, ning see ei erine sensibilisatsioonita ja sensibilisatsiooniga astma ning tervete laste vahel. Samuti ei leitud mingit statistiliselt olulist erinevust sissehingatavate allergeenide sensibilisatsiooni juhul. Neutrofiilide, lümfotsüütide, monotsüütide, eosinofiilide ja basofiilide absoluut- ja suhtarvud ning valgeliblede üldarv nii sensibilisatsioonita ja sensibilisatsiooniga mistahes allergeeni kui ka sissehingatavatele allergeenidele sensibilisatsioonita ja sensibilisatsiooniga astmaga lastel on toodud tabelites (Tabel 4, Tabel 5).

Kaasuva allergilise haiguse esinemine oli seotud muutustega monotsüütide suhtarvus (Joonis 4). Neutrofiilide, lümfotsüütide, monotsüütide, eosinofiilide ja basofiilide absoluut- ja suhtarvud ning valgeliblede üldarv on toodud tabelis (Tabel 4, Tabel 5).



Joonis 4. Monotsüütide suhtarvud (keskmine + standardhälve).

Monotsüütide suhtarv ilma kaasuva haiguseta astmaga lastel oli kõrgem võrreldes tervete lastega ($11 \pm 0,7$ vs. $9 \pm 0,3\%$, $p=0,003$, Joonis 4). Lisaks leiti, et monotsüütide suhtarv ilma kaasuva allergilise haiguseta astmaga lastel oli kõrgem võrreldes astmaga lastega, kellel kaasnes allergiline haigus ($11 \pm 0,7$ vs. $9 \pm 0,6\%$, $p=0,028$, Joonis 4).

2.3.4 Laste kokkupuude tubakasuitsuga

Uuringus osalenud laste seas 253 (34%) olid puutunud suitsuga kokku kas ante- või postnataalselt. 185 (25%) last oli eksponeeritud tubakasuitsule antenataalselt, nendest 56 (30%) last ainult antenataalselt. Ainult postanatselt suitsuga puutus kokku 67 (9%) last. 195 last (26%) viibis tubakasuitsuga ruumides. Suurem osa lastest viibis suitsuga ruumides harvem kui kord nädalas (83%). Igapäevaselt viibis 8 last (4%) ruumis, kus esines tubakasuitsu. 4% emadest suitsetasid raseduse ajal. 168 naist (23%) kinnitas, et raseduse ajal nad viibisid tubakasuitsuga ruumides. Nendest 79% viibis tubakasuitsuga ruumis vähem kui

korra nädalas ning 8% igapäevaselt. 4% emadest suitsetasid rinnaga toitmise ajal ning 45 naist (6%), kusjuures suurem osa neist (76%) harvem kui korra nädalas, viibisid suitsuga ruumides rinnaga toitmise ajal. Igapäevaselt viibis tubakasuitsuga ruumides 13% rinnaga toitvatest emadest. 503 vanemat kinnitasid, et nad olid suitsetanud mistahes eluhetkel, neist 66% moodustasid laste isad. 123. peres suitsetasid mistahes ajahetkel nii ema kui ka isa. 256 inimest loobus suitsetamisest enne lapse sündi.

Kasutades Hii-ruut ja Fisher testi analüüsi astma esinemisriski sõltuvalt tubakasuitsuga kokkupuute sagedusest. Leiti, et astma esinemissagedus oli kõrgem lastel, kes viibisid suitsuga ruumis igapäevaselt ($p=0,007$). Samuti astma esinemissagedus oli kõrgem, kui lapse ema suitsetas või viibis raseduse ajal tubakasuitsuga ruumides rohkem kui üks kord nädalas ($p=0,016$).

2.3.5 Laste valgeliblede diferentsiaalvalu sõltuvus suitsuga kokkupuutest

Valgeliblede alaklasside absoluut- ja suhtarvud ning valgeliblede üldarv lastel, kokkupuute gruppide kaupa, on toodud tabelites 6 ja 7.

Tabel 6. Valgeliblede suhtarvud astma ja suitsuga kokkupuute gruppide kaupa.

Grupid	PMN	Lf	Mo	Eos	Bas
Astmaga lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku	50±3	32±2	10±0,8	8±2	0,2±0,06
Astmaga lapsed, kes olid eksponeeritud tubakasuitsule postnataalselt	49±6	31±5	14±1	6±2	0,4±0,2
Astmaga lapsed, kes olid eksponeeritud tubakasuitsule antenataalselt	55±4	28±3	10±0,6	8±1	0,2±0,06
Terved lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku	52±2	32±2	9±0,3	6±0,5	0,3±0,05
Terved lapsed, kes olid eksponeeritud tubakasuitsule postnataalselt	56±3	27±2	9±1	7±1	0,2±0,06
Terved lapsed, kes olid eksponeeritud tubakasuitsule antenataalselt	48±4	36±4	8±0,8	8±2	0,3±0,07

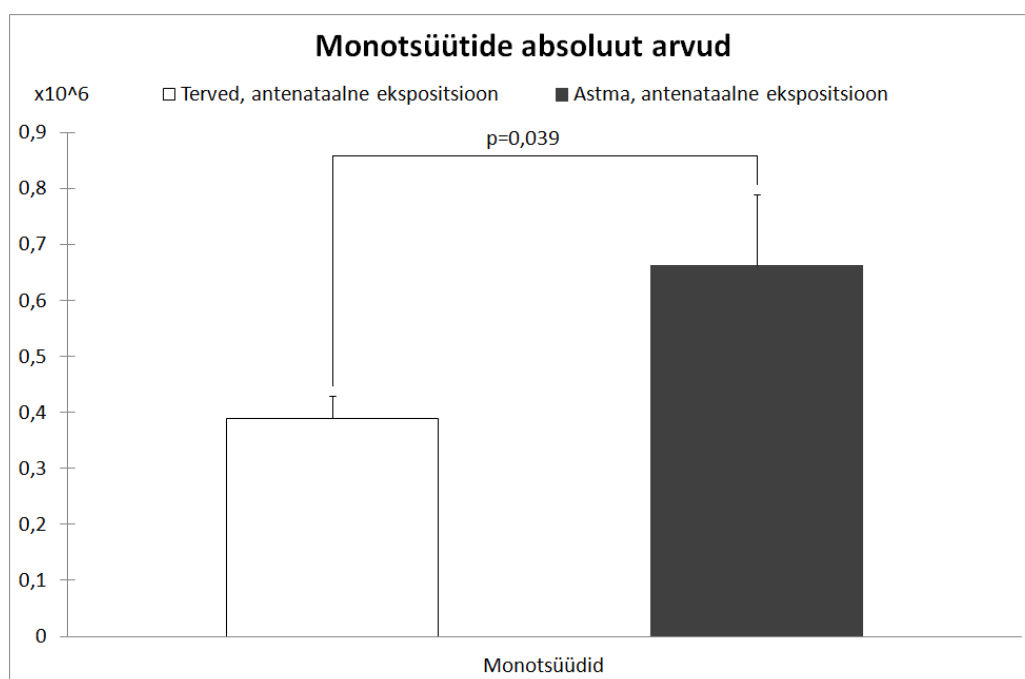
Arvud on esitatud: keskmine arv ± standardhälve. Lühendid: PMN – neutrofiil; Lf – lümfotsüüt; Mo – monotsüüt; Eos – eosinofiil; Bas – basofiil.

Tabel 7. Valgeliblede absoluutarvud ja üldarv (rakku $\times 10^6$) suitsuga kokkupuute gruppide kaupa.

Grupid	PMN	Lf	Mo	Eos	Bas	Valgeliblede üldarv
Astmaga lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku	2,8 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,06	0,4 \pm 0,07	0,01 \pm 0,004	5,6 \pm 0,5
Astmaga lapsed, kes viibis suitsuga ruumis	3,3 \pm 0,7	2,4 \pm 0,9	1,0 \pm 0,3	0,3 \pm 0,07	0,02 \pm 0,01	7,0 \pm 1,7
Astmaga lapsed, kelle vanemad suitsetasid	3,6 \pm 0,6	1,7 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,01	0,01 \pm 0,006	6,5 \pm 1
Terved lapsed, kes ei puutunud suitsuga kokku	2,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,3	0,3 \pm 0,04	0,02 \pm 0,003	5,2 \pm 0,3
Terved lapsed, kes viibis suitsuga ruumis	3,7 \pm 0,4	1,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,06	0,4 \pm 0,08	0,01 \pm 0,004	6,4 \pm 0,4
Terved lapsed, kelle vanemad suitsetasid	2,3 \pm 0,4	1,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,04	0,4 \pm 0,1	0,01 \pm 0,003	4,8 \pm 0,4

Arvud on esitatud: keskmine arv \pm standardhälve. Lühendid: PMN – neutrofiil; Lf – lümfotsüüt; Mo – monotsüüt; Eos – eosinofiil; Bas – basofiil.

Ainuke rakutüüp, mille absoluutarvu erinevus gruppide vahel oli statistiliselt oluline, oli monotsüüt (Joonis 5).

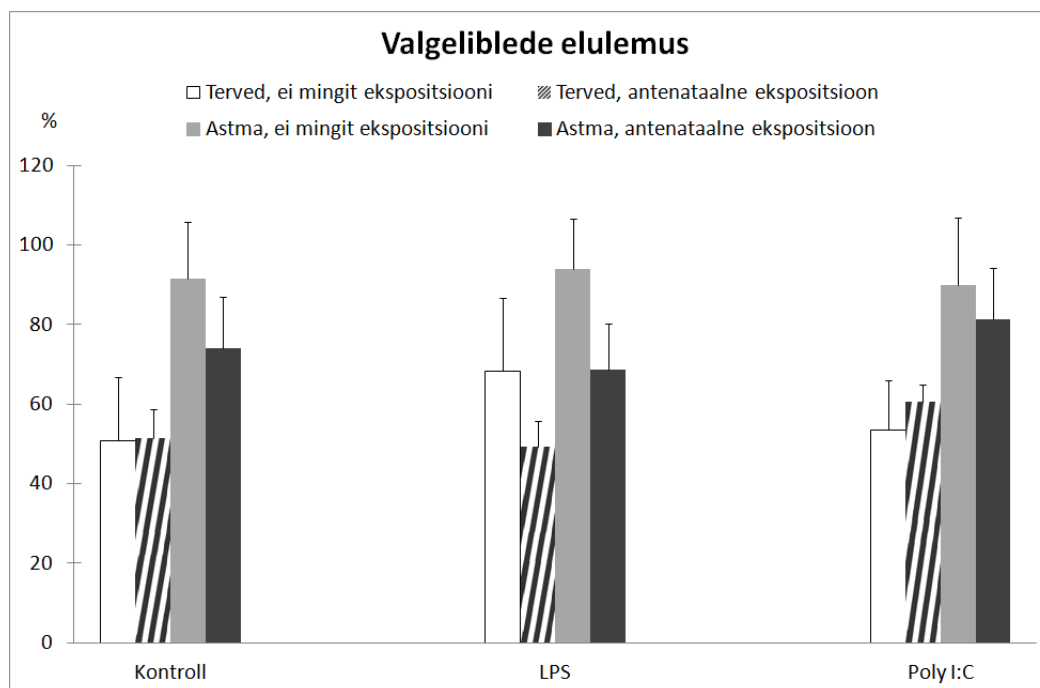


Joonis 5. Monotsüütide absoluutarvud (keskmine + standardhälve).

Monotsüütide absoluutarv oli kõrgem antenataalse tubakasuitsuga kokkupuute korral astmaga grupis võrreldes tervete laste grupiga (0,7 \pm 0,1 vs. 0,4 \pm 0,04 rakku $\times 10^6$ /ml, $p=0,039$, Joonis 5).

2.3.6 Valgeliblede elulemus peale stimulatsiooni

20 lapse valgelibled stimuleeriti LPS- ja *Poly I:C*-ga ööpäeva jooksul. Kontrolliks inkubeeriti rakud samas lahuses ilma LPS või I:C lisamiseta. Peale inkubatsiooni kontrolliti rakkude elulemust (Joonis 6).



Joonis 6. Valgeliblede elulemus peale inkubatsiooni (keskmine + standardhälve).

Analüüs ei näidanud statistiliselt olulist erinevust valgeliblede elulemuses gruppide vahel. Siiski astmaga lastel oli rakkude elulemus keskmiselt kõrgem võrreldes tervete lastega (Joonis 6).

2.3.7 Erinevate valgeliblede alaklasside elulemus peale stimulatsiooni

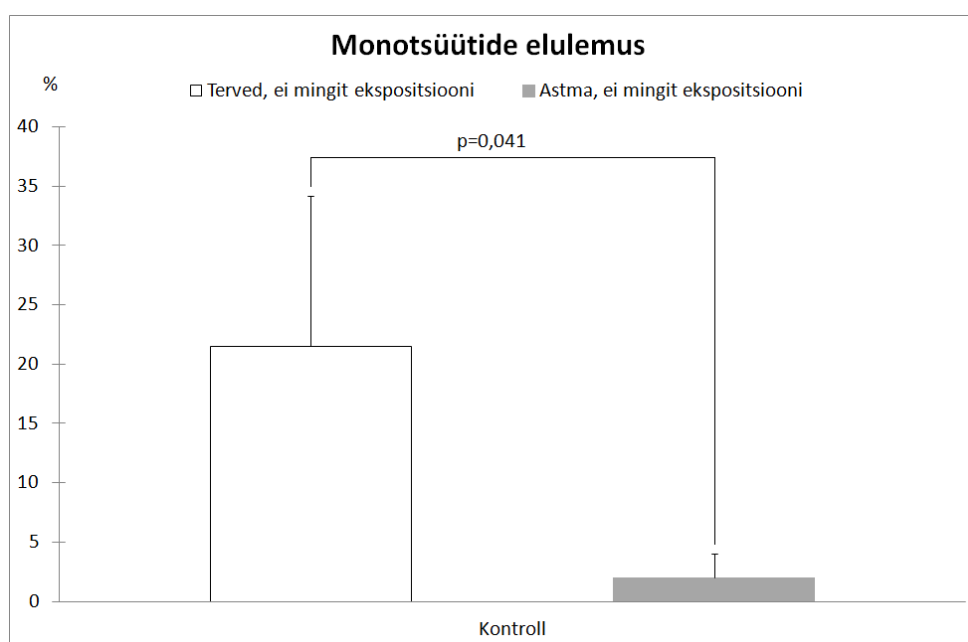
Lisaks vaadati erinevate valgeliblede alaklasside elulemust peale rakkude stimulatsiooni (Tabel 8).

Tabel 8. Valgeliblede elulemus peale ööpäeva stimulatsiooni LPS ja dsRNA-ga.

Grupid	Stimulatsioon	Lf (%)	Mo (%)	Eos (%)
Terved lapsed, kellel ei olnud tubakasuitsule ekspositsiooni	Negatiivne	56±17	22±13	198±98
	LPS	79±20	29±11	247±130
	<i>Poly I:C</i>	67±12	19±7	23±16
Terved lapsed, kellel oli antenataalne tubakasuitsule ekspositsioon	Negatiivne	60±8	18±13	73±16
	LPS	61±11	10±7	64±12
	<i>Poly I:C</i>	105±12	12±6	9±5
Astmaga lapsed, kellel ei olnud tubakasuitsule ekspositsiooni	Negatiivne	105±17	2±2	532±318
	LPS	107±15	33±19	288±68
	<i>Poly I:C</i>	129±21	12±7	56±30
Astmaga lapsed, kellel oli antenataalne tubakasuitsule ekspositsioon	Negatiivne	64±12	25±10	170±79
	LPS	75±12	19±8	129±48
	<i>Poly I:C</i>	76±14	22±10	25±13

Arvud on esitatud: keskmine arv ± standardhälve. Lühendid: Lf – lümfotsüüt; Mo – monotsüüt; Eos – eosinofiil.

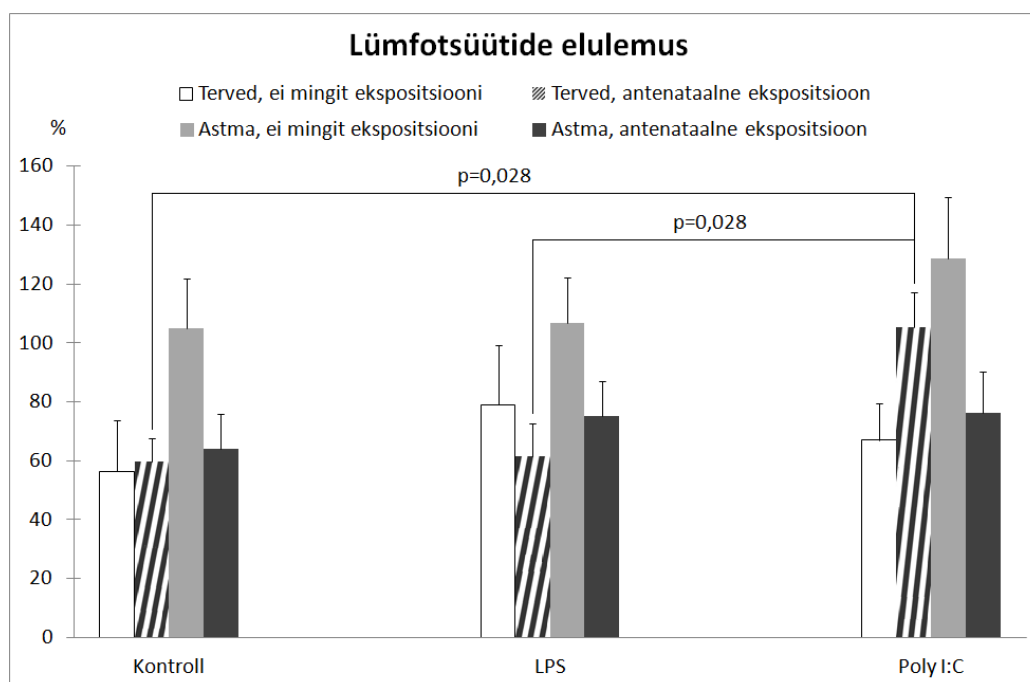
Kontrolliks inkubeeriti valgelibled ilma stimulatsioonita. Monotsüütide elulemus oli astmaga lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku, väiksem võrreldes tervete lastega, kes samuti ei puutunud suitsuga kokku (2±2 vs. 22±13%, $p=0,041$, Joonis 7).



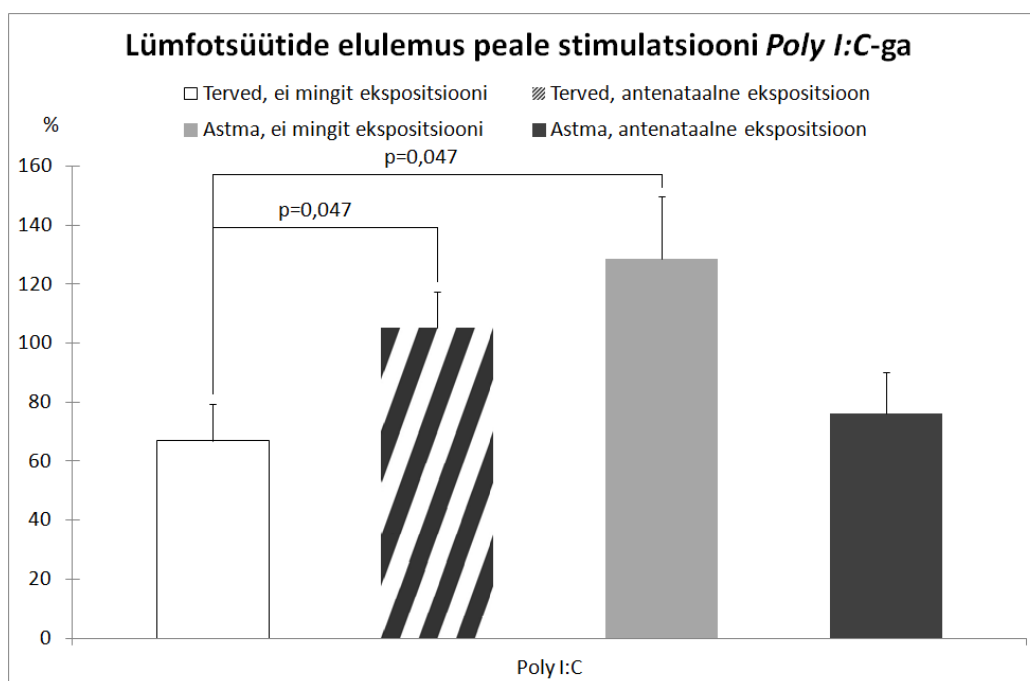
Joonis 7. Monotsüütide elulemus ilma stimulatsioonita (keskmine + standardhälve).

Stimulatsioon bakteriaalse lipopolüsahhariidiga ei kutsunud esile statistiliselt olulisi muutusi rakkude elulemuses. Lisaks ei toimunud monotsüütide elulemuses statistiliselt olulisi muutusi ka peale viirusliku dsRNA molekulidega stimuleerimist.

Siiski esinesid statistiliselt olulised muutused peale stimulatsiooni dsRNA molekulidega lümfotsüütide elulemuses (Joonis 8, Joonis 9).



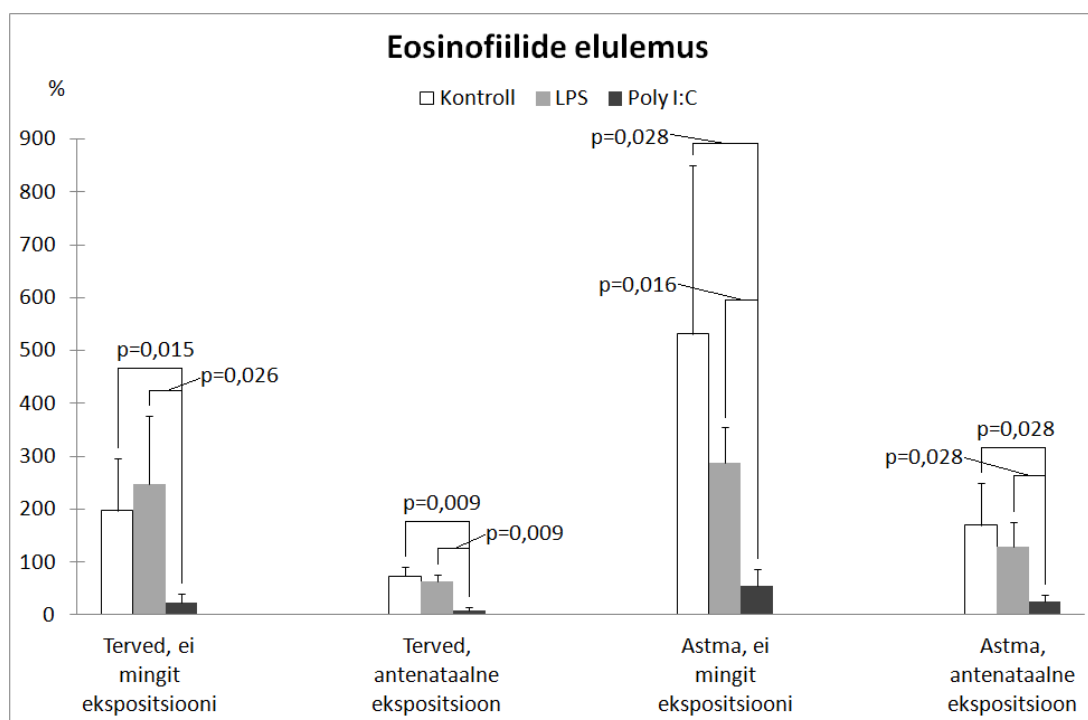
Joonis 8. Lümfotsüütide elulemus (keskmine + standardhälve).



Joonis 9. Lümfotsüütide elulemus peale stimulatsiooni *Poly I:C*-ga (keskmine + standardhälve).

Lümfotsüütide elulemus oli peale stimulatsiooni dsRNA molekulidega statistiliselt oluliselt kõrgem tervetel lastel, kes puutusid suitsuga kokku võrreldes nii kontrolliga (105 ± 12 vs. $60 \pm 8\%$, $p=0,028$, Joonis 8) kui ka sama grupi LPS stimulatsiooniga (105 ± 12 vs. $61 \pm 11\%$, $p=0,028$, Joonis 8). Peale *Poly I:C*-ga stimulatsiooni oli lümfotsüütide elulemus oluliselt kõrgem tervetel lastel, kes puutusid suitsuga kokku võrreldes tervete lastega, kes ei puutunud suitsuga kokku (105 ± 12 vs. 67 ± 12 , $p=0,047$, Joonis 9). Lisaks leiti, et lümfotsüütide elulemus oli oluliselt kõrgem astmaga grupis võrreldes tervete suitsuga mittekokkupuutunud laste grupiga (129 ± 21 vs. 67 ± 12 , $p=0,047$, Joonis 9).

Peale stimulatsiooni dsRNA-ga langes eosinofiilide elulemus statistiliselt oluliselt kõikide gruppide vahel võrreldes kontrolliga (tervetel lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku vastavalt 23 ± 16 vs. $198 \pm 98\%$, $p=0,015$; tervetel lastel, kes puutusid suitsuga kokku vastavalt 9 ± 5 vs. $74 \pm 16\%$, $p=0,009$; astmaga lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku vastavalt 56 ± 30 vs. $532 \pm 318\%$, $p=0,028$; astmaga lastel, kes puutusid suitsuga kokku vastavalt 25 ± 13 vs. $170 \pm 79\%$, $p=0,028$, Joonis 10). Samuti toimus oluline langus eosinofiilide elulemuses kõikiges gruppides peale stimulatsiooni dsRNA-ga võrreldes eosinofiilide elulemusega kõikiges gruppides peale stimulatsiooni LPS-ga (tervetel lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku vastavalt 23 ± 16 vs. $247 \pm 130\%$, $p=0,026$; tervetel lastel, kes puutusid suitsuga kokku vastavalt 9 ± 5 vs. $64 \pm 12\%$, $p=0,009$; astmaga lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku vastavalt 56 ± 30 vs. $288 \pm 68\%$, $p=0,016$; astmaga lastel, kes puutusid suitsuga kokku vastavalt 25 ± 13 vs. $129 \pm 48\%$, $p=0,028$, Joonis 10).



Joonis 10. Eosinofiilide elulemus (keskmine + standardhälve).

2.4 Arutelu

Selle magistritöö tulemused näitavad, et väikelaste passiivne suitsetamine ning astma esinemissagedus püsivad Eestis suhteliselt kõrgel tasemel. Regulaarne tubakasuitsuga kokkupuude, kusjuures seda just antenataalselt, on seotud astma esinemissageduse tõusuga. Intensiivsema nii ante- kui ka postnataalse tubakasuitsuga kokkupuutega laste seas oli astma osakaal kõrgem ning selle põhjustajaks võib olla suitsust tingitud mõju immuunsüsteemile. Astmaga lastel ning lastel, kes antenataalselt puutusid suitsuga kokku, on toimunud sarnased muutused valgeliblede koosseisus, nimelt suurenes vere monotsüütide arv. Leiti, et astmahaigetel vere monotsüütide, kuid mitte teiste rakkude, suhtarv suurenes ning oli rohkem väljendunud ilma kaasuva allergilise haiguseta lastel. Toimuv arvukuse suurenemine ei olnud aga tingitud pikenenud monotsüütide elulemusest. Seost antenataalse suitsetamise ning astma esinemise vahel tõestavad ka *in vitro* eksperimentide tulemused. Stimulatsioon dsRNA molekuliga põhjustas tervetel suitsule eksponeeritud lastel ning astmahaigetel sarnast muutust lümfotsüütide elulemuses, nimelt nende elulemuse kasvu.

Viimasel ajal on palju räägitud passiivse tubakasuitsu kahjulikkusest tervisele astma näol ning selle tõestamiseks on läbiviidud mitmed uuringud (Lister ja Jorm, 1998; Gergen *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012). Antud töö eesmärgiks oli aga vaadelda, millised võiksid olla sellise mõju taga olevad patogeneesi mehhanismid. Antud uuringu raames olid kogutud ulatuslikud epidemioloogilised (eelkõige tubakasuitsule ekspositsioonist ja uuritavate tervist puudutavad) andmed ning paljud vereproovid. Viimased võimaldasid täiendavalt, *in vitro* kastete käigus, uurida täpsemalt tubakasuitsuga kokkupuute ja astma taga seisvaid mehhanisme.

Antud uuringus leiti, et liigi veerand väikelastest on viibinud tubakasuitsuga ruumides ning umbes samapalju on puutunud kokku tubakasuitsuga antenataalselt, s.o kui ema rasedana kas ise suitsetas (4%) või viibis tubakasuitsuga ruumis (23%). Ligi 20 aastat tagasi Vasar (2000) ja kaastöötajad näitasid, et neli protsenti laste emadest suitsetas raseduse ajal ja 29% laste vanematest kinnitasid suitsetamist kodus. Seega võib järeldada, et olukord laste passiivse suitsetamisega ei ole viimase aja jooksul paranenud, ning rakendatavad meetmed riigi ja ühiskonna poolt ei ole piisavalt efektiivsed.

ALLERGOFOOD projekti andmetel saadud tulemused näitasid, et astma esinemissagedus kasvas statistiliselt oluliselt juhul, kui laps postnataalselt igapäevaselt puutus suitsuga kokku. Antenataalne kokkupuude suitsuga sagedamini kui kord nädalas põhjustas samuti lastel astma esinemissageduse tõusu. Need tulemused on kooskõlas varasemate uuringute tulemustega, mis näitasid, et suurema suitsu kogusega kokkupuude avaldas rohkem mõju laste hingamisteede tervisele (Braback *et al.*, 1995; Gergen

et al., 1998; Lister ja Jorm, 1998; Tsai *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2012; Schvartsman *et al.*, 2013). Samuti antud magistritöö tulemused kinnitavad, et antenataalne suitsetamine soodustab lastel hingamisteede haiguste teket ning mõjutab laste hingamisteede tervist rohkem kui postnataalne passiivne suitsetamine (Gilliland *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004; Haberg *et al.*, 2007; Lapin *et al.*, 2015).

Antud töö tulemused näitasid, et Eestis on üheaastaste laste seas astma esinemissagedus kaks ja kaheaastaste laste seas 6%. 1990. aastate keskel tehtud sünnikohordi uuringus leiti, et astma esinemissagedus üheaastastel lastel oli 0,5-1% ja 2-aastastel lastel 2-2,5% (Vasar *et al.*, 2000; Julge *et al.*, 2001). Teises sünnikohordi uuringus, mis teostati 2000. aastate alguses leiti, et üheaastastel lastel oli astma esinemissagedus kolm, kuid kaheaastastel lastel 6% (Voor ja Julge, 2004; Voor, 2005). Seega meie andmed ei kinnita astma esinemissageduse tõusu Eesti väikelastel ning võib loota, et seisund on stabiliseerunud, kuid kahjuks oleme jõudnud Lääne-Euroopa kõrge tasemeni (Karvonen *et al.*, 2015).

Varasemalt näitasid Voor ja Julge, et kaheaastastest astmaga lastest 30% esines kaasuva haigusena atoopiline dermatiit (Voor ja Julge, 2005). Meie uuringus antud haigus esines 46,5% astmaga lastest, ehk atoopilise dermatiidi esinemissagedus antud patsientide seas on kasvanud viimaste 15 aasta jooksul.

Käesoleva magistritöö autori meelest on see esimene töö, mis näitas statistiliselt olulist erinevust monotsüütide suhtarvus astmaga ja tervete laste vahel. Kuigi monotsüütide rolli astma patogeneesis uuriti ka teistes teadustöödes (Gant *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004) ei ole nendes uuringutes leitud monotsüütide arvu muutust. Varasemalt on näidatud eosinofiilide arvu suurenemist astma olemasolul (Bousquet *et al.*, 1990; Hoekstra *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2001; Karakoc *et al.*, 2002; Machura *et al.*, 2010). Ka antud töös esines eosinofiilide arvu kasv astmaga lastel võrreldes tervete lastega, aga see ei olnud statistiliselt oluline. Selle üheks võimalikest põhjustest on antud uuringus osalenute seas mitteallergilise astmaga laste ülekaal. Kooskõlas varasemalt tehtud uuringuga on väikelaste astma tavaliselt mitteallergiline (Wever-Hess *et al.*, 1999). Käesolevas töös leiti, et monotsüütide suhtarv oli statistiliselt oluliselt kõrgem astmaga lastel, kellel ei olnud kaasuvat allergilist haigust. Üheks kõrgenenud monotsüütide arvu seletavaks mehhanismiks võib olla pikenenud rakkude elulemus. Antud töö *in vitro* tehtud eksperimendid aga ei kinnitanud antud hüpoteesi, kuna astma haigete stimuleerimata monotsüütide elulemus oli madalam võrreldes tervete lastega.

Lisaks näitavad käesoleva töö tulemused, et tubakasuitsuga kokkupuude võimendab monotsüütide absoluutarvu kõrgenemist astma haigetel veelgi. Nõnda oli antenataalselt suitsuga kokkupuutunud astmaga laste monotsüütide absoluutarv statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes tervete lastega, kelle ekspositsioon tubakasuitsule oli sama. Meie *in vitro* eksperimendid välistasid, et uuringus leitud monotsüütide arvu suurenemise põhjuseks võib olla monotsüütide pikenenud elulemus. Kuna nii

antenataalne suitsetamine kui ka astma olemasolu on seotud monotsüütide arvu tõusuga, saab oletada, et lastel antenataalse tubakasuitsuga kokkupuute ja astma esinemise vahel esineb seos just monotsüütide kaudu. Monotsüütide arvukuse muutuse mehhanismid nii astma kui ka lapse antenataalse suitsetamise korral vajavad edasist uurimist ning üheks võimalikuks mehhanismiks võib olla monotsüütide produktsiooni tõus.

Viirused on tuntud astma ägenemise põhjustajad. On teada, et astmahaigete valgeliblel on häiritud vastus viirusinfektsioonidele, mis avaldub interferoonide tootmise languse kaudu (Isaacs *et al.*, 1981; Copenhaver *et al.*, 2004; Guerra *et al.*, 2004; Gern *et al.*, 2006; Durrani *et al.*, 2012; Contoli *et al.*, 2015). Antud andmete põhjal otsustati teostada *in vitro* eksperimendid, et kontrollida, kas tegelikult astmahaigetel on häiritud viiruslikele nakkustele reageerimisvõime raku tasemel ning kas need häired on põhjustatud antenataalselt suitsuga kokkupuute poolt. Stimulatsiooniks valiti viirusliku dsRNA ning bakteriaalse lipopolüsahhariidi molekulid, mis sunnivad valgeliblesid tegutsema sarnaselt, nagu vastavalt viirusliku või bakteriaalse nakkuse korral. Tulemused näitasid, et stimulatsioon LPS-ga ei põhjustanud statistiliselt olulist muutust erinevate valgeliblede elulemuses. Samal ajal Préfontaine (2010) ja tema töökaaslased leidsid, et vastus lipopolüsahhariididele on häiritud atoopiaga lastel. Quah (2011) ja tema kolleegid samuti näitasid, et väikelastel, kellel oli atopia või vilistava hingamise tekkerisk oli lipopolüsahhariididele vastus häiritud. Arvatavasti tulemuste erinevus pärineb asjaolust et meie uuringus osalenud astmaga lapsed põdesid pigem mitteallergilist astmat, ehk on võimalik, et pigem atopia olemasolu kui astma esinemine määrab vastuse bakteriaalsetele infektsioonidele.

Stimulatsioon dsRNA-ga põhjustas muutusi vere eosinofiilide ja lümfotsüütide elulemuses. Lümfotsüütide elulemus tervetel antenataalselt suitsule eksponeeritud lastel oli statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes tervete lastega, kes ei puutunud suitsuga kokku. Lisaks oli lümfotsüütide elulemus astmaga lastel, kes ei puutunud suitsuga kokku statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes tervete lastega, kes ei puutunud suitsuga kokku. Stimulatsioon dsRNA-ga põhjustas tervetel lastel, kes puutusid antenataalselt suitsuga kokku, statistiliselt olulist lümfotsüütide elulemuse kasvu võrreldes kontrolliga. Antud tulemused näitavad, et antenataalne suitsetamine ja astma olemasolu suurendavad lümfotsüütide elulemust peale stimulatsiooni dsRNA-ga. Zhu (2014) ja tema töökaaslased pakkusid oma uuringu tulemuste alusel, et täiskasvanutel osalesid nii T- kui ka B-lümfotsüüdid viirustega-indutseeritud astma ägenemise tekkes. Samal ajal käesolevas teadustöös saadud tulemused kinnitavad, et peale rakkude kokkupuudet viirustega, toimub lümfotsüütide elulemuse kõrgenemine ja see on üks võimalikest mehhanismidest lümfotsüütide arvukuse tõusuks, mida on korduvalt näidatud viirusinfektsioonide korral (Török-Vistai *et al.*, 2013; Sprague *et al.*, 2015). Eosinofiilide elulemus langes peale stimulatsiooni dsRNA-ga sarnaselt kõikides gruppides, mis vihjab asjaolule, et vere eosinofiilide elulemus viirusnakkuse korral langeb sõltumatu

astma või tubakaekspositsiooni olemasolust. Samas, hetkel kirjanduse andmed eosinofiilide elulemuse kohta viirusinfektsioonide korral nii astmaga lastel kui ka tubakasuitsuga kokkupuude korral, on limiteeritud ning meie tulemused vajavad kinnitamist.

Antud töö näitab selgelt, et suitsetamine on ohtlik mitte ainult suitsetajale endale vaid ka kõrvalsuitsu sees tahtmatult olevatele lastele ja raseda korral veel suuremal määral tema tulevasele lapsele. Kuna tegemist on kergesti välditava tõsiste haiguste riskifaktoriga, peab kasutama igat võimalust sellise ekspositsiooni ärahoidmiseks. Viimaste 20 aasta jooksul on väikelaste tubakasuitsuga kokkupuude ning aktiivne ja/või passiivne rasedate suitsetamine püsinud samal tasemel, mis nõuab kindlalt rohkemat tähelepanu ja tööd ühiskonna k.a. riigi poolt. Rakulisel tasemel vihjavad meie tulemused, et vere monotsüütidel võib olla oluline osa passiivsest suitsetamisest indutseeritud astma patogeneesi rajal, asjaolu mis väärrib edasist uurimist.

KOKKUVÕTE

Passiivne suitsetamine soodustab mitmete haiguste teket, sealhulgas astmat, mis on tingitud hingamisteedes õhuvoolu takistusest. Täpsed mehhanismid, mille kaudu suudab passiivne suitsetamine põhjustada astmaga seotud sümptomite teket, on siiaeni teadmata. Samuti paljud uurimistööd näitavad, et passiivne suitsetamine mõjutab valgevereliblede koosseisu muutust ning interferoonide defitsiiti. Sarnased häired esinevad ka astma puhul.

Käesoleva lõputöö eesmärkideks oli leida ALLERGOFOOD projekti andmete põhjal, kas astmaga kaasnevad muutused valgeliblede koosseisus on tingitud passiivse suitstemise poolt. Selleks uuriti valgeliblede koosseisu astmaga ja tervetel lastel ning võrreldi andmeid sõltuvalt tubakasuitsuga kokkupuute olemasolust. Lisaks vaadati erinevate valgeliblede elulemuse muutust peale rakkude stimulatsioone bakteriaalse lipopolüsahhariidi või viirusliku dsRNA molekulidega. Antud magistritöös saadud tulemuste analüüsimisel tehti järgmised järeldused:

- Väikelaste astma esinemissagedus ei ole muutunud viimaste 15 aastate jooksul;
- Astma esinemise risk suurenes kui laps oli eksponeeritud tubakasuitsule postnataalselt igapäevaselt või antenataalselt rohkem kui korra nädalas;
- Astma esinemine oli seotud kõrgendanud monotsüütide arvuga veres;
- Tubakasuitsuga kokkupuute põhjustas monotsüütide arvu tõusu veres eelkõige astmaga lastel;
- Monotsüütide arvukuse tõus nii astma kui ka antenataalse suitsetamise korral ei olnud tingitud monotsüütide pikenenud elulemusest;
- Stimulatsioon dsRNA molekuliga põhjustas vere lümfotsüütide elulemise tõusu ning eosinofiilide elulemuse langust, lümfotsüütide ds-RNA-indutseeritud elulemise tõus esines tervetel tubakasuitsule eksponeeritud lastel ja astmahaigetel.

Selle magistritöö tulemused näitavad, et regulaarne tubakasuitsuga kokkupuute eriti antenataalselt on seotud astma esinemissageduse tõusuga. Astmaga lastel ning lastel, kes antenataalselt puutusid suitsuga kokku, on toimunud sarnased muutused valgeliblede koosseisus, nimelt on suurenenud vere monotsüütide arv. Toimuv arvukuse suurenemine ei olnud aga tingitud pikenenud monotsüütide elulemusest. See annab alust oletada, et monotsüütide arvukuse suurenemine toimus muu mehhanismi kaudu, näiteks proliferatsiooni kasvust, mis väärib aga edasist uurimist. Seost antenataalse suitsetamise ning astma vahel tõestavad ka *in vitro* eksperimentide tulemused. Stimulatsioon dsRNA molekuliga põhjustas tervetel suitsule eksponeeritud lastel ning astmahaigetel sarnast muutust lümfotsüütide elulemuses, nimelt nende

elulemus kasvas. Saadud tulemused vihjavad, et vere monotsüütidel võib olla oluline osa passiivsest suitsetamisest indutseeritud astma patogeneesi rajal, asjaolu mis väärib edasist uurimist.

The effect of passive smoking on the manifestation of asthma in infants

Anastassia Lenskaja

SUMMARY

Passive smoking induces the development of multiple diseases, including asthma, which is caused by the impediment of airflow in the respiratory tract. The exact mechanisms, through which passive smoking may cause asthma-associated symptoms remain mostly unknown. Also, a variety of research papers show that passive smoking affects the leukocytes' differential counts, along with causing interferone deficit, which is similar to the impairments seen in asthma.

The aim of this thesis was to conclude, using the data from the ALLERGOFOOD project, whether the asthma-concurrent changes in leukocytes' differential counts were conditioned by passive smoking. For this purpose, different leukocyte subtypes of both asthmatic and healthy children were examined and furthermore compared, correlating to data regarding the children's contact with tobacco smoke. In addition, changes in various leukocytes' survival rates after the stimulation of cells with lipopolysaccharide or viral dsRNA molecules were evaluated. The following conclusions were deduced based on the analysis of this Master's thesis' findings:

- Asthma prevalence in toddlers has not changed during the last 15 years;
- The risk of asthma occurrence grew if the exposure of the child to tobacco smoke was on a daily basis postnatally or happened more than once a week antenatally;
- Asthma was associated with elevated levels of monocytes in blood;
- Contact with tobacco smoke caused an increase of monocyte numbers in blood particularly in children with asthma;
- Growth of monocyte quantities in case of both asthma and passive smoking were not caused by their (monocyte) prolonged survival rates;
- The stimulation with dsRNA molecules induced a growth in blood lymphocytes' survival rates, as well as a decline in the survival of eosinophils, the dsRNA-induced increase in lymphocyte survival rates appeared in both healthy children exposed to tobacco smoke and asthmatics;

The results of this thesis show that regular contact with tobacco smoke, especially antenatal, is associated with a rise in asthma occurrence frequency. Children with asthma and children exposed to smoke antenatally have exhibited similar deviations in leukocytes' composition, namely the growth of blood monocyte numbers. However, the growth in multitude was not an effect of the monocytes' prolonged survival. This forms a basis for the assumption that the growth in monocyte numbers happened by means of another mechanism, for instance cell proliferation, which deserves further evaluation. The connection between asthma and antenatal smoking was also supported by the results from the *in vitro* experiments. Stimulation with dsRNA molecules caused a similar change in lymphocyte survival rates in both asthmatics and healthy children exposed to tobacco smoke, namely the rates grew. The obtained results suggest that the blood monocyte may be an important part of passive smoking-induced asthma pathogenesis, and calls for further investigation.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat Berit Pilden-Sarve õigeaegse abi, heade nõuannete ja asjalike kommentaaride eest. Annan oma südamlikku tänuavaldust minu kaasjuhendajale Svetlana Sergejevale väärtuslike nõuannete, asjalike ja huvitavate arutelude ning abivalmiduse eest. Suured tänud ka minu kaasjuhendajale Renata Melnikovale kriitiliste kommentaaride ning heade ja väärtuslike nõuannete eest. Samuti tänan ALLERGOFOOD projekti töötajaid sõbralikkuse ja hea koostöötamise eest. Eraldi tänan Carolin Faltenit, kes aitas ekperimentide läbiviimisel, ning Siim Kruvitsat, kes aitas statistilise analüüsiga.

Kasutatud kirjandus

- Akelma, A. Z., Kanburoglu, M. K., Cizmeci, M. N., Mete, E., Catal, F., Tufan, N. (2015). Level of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in childhood asthma. *Allergol Immunopathol.* **43**: 142-146.
- Akerman, S., Williamson, D. J., Kaube, H., Goadsby, P. J. (2002). The role of histamine in dural vessel dilation. *Brain Res.* **956**: 96-102.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. 4th edition. *New York: Garland Science.*
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* **413**: 732-738.
- Annus, T., Julge, K., Kivivare, M., Putnik, U., Ress, K., Vasar, M., Veidrik, K. (2010). Astma lapseas. Eesti ravijuhend 2009. *Eesti Arst.* **89**: 207-206.
- Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., O'Byrne, P., Pedersen, S. E., Pizzichini, E., Sullivan, S. D., Wenzel, S. E., Zar, H. J. (2008). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* **31**: 143-178.
- Bisgaard, H., Hermansen, M. N., Bønnelykke, K., Stokholm, J., Baty, F., Skytt, N. L., Aniscenko, J., Kebabdz, T., Johnston, S. L. (2010). Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study. *BMJ.* **341**: 1-6.
- Bousquet, J., Chanques, P., Lacoste, J. Y., Barnéon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., Godard, P., Michel, F. B. (1990). Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* **323**: 1033-1039.
- Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnston, M., Vignola, A. M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**: 1720-1745.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* **303**: 1532-1535.
- Bråback, L., Breborowicz, A., Julge, K., Knutsson, A., Riikjäär, M. A., Vasar, M., Björkstén, B. (1995). Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitisation in the Baltic area. *Arch Dis Child.* **72**: 487-493.
- Bradding, P., Roberts, J. A., Britten, K. M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C. H., Howarth, P. H., Holgate, S. T. (1994). Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in

normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**: 471-480.

Bretz, U., Baggolini, M. (1974). Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* **63**: 251-269.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* **303**: 1532-1535.

Bufe, A., Gehlhar, K., Grage,-Griebenow, E., Ernst, M. (2002). Atopic phenotype in children is associated with decreased virus-induced interferon-alpha release. *Int Arch Allergy Immunol.* **127**: 82-88.

Burke, L. A., Hallsworth, MP., Litchfield, T. M., Davidson, R., Lee, T. H. (1991). Identification of the major activity derived from cultured human peripheral blood mononuclear cells, which enhances eosinophil viability, as granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Allergy Clin Immunol.* **88**: 226-235.

Burnet, F. M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* **26**: 119-121.

Gant, V., Cluzel, M., Shakoor, Z., Rees, P. J., Lee, T. H., Hamblin, A. S. (1992). Alveolar macrophage accessory cell function in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* **146**: 900-904.

Giraldi, L., Sudi, K., Muntean, W. (2000). Effect of heparin, platelets, activated platelets, platelet fragments, and hematocrit on activated clotting time. *Artif Organs.* **24**: 507-513.

Chan-Yeung, M., Dimich-Ward, H. (2003). Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Respirology.* **8**: 131-139.

Cho, S. H., Stanciu, L. A., Holgate, S. T., Johnston, S. L. (2005). Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **171**: 224-230.

Cinar, N., Dede, C., Cevahir, R., Sevimli, D. (2010). Smoking status in parents of children hospitalized with a diagnosis of respiratory system disorders. *Bosn J Basic Med Sci.* **10**: 319-322.

Cluitmans, F. H. M., Esendam, B. H. J., Veenhof, W. F. J., Landegent, J. E., Willemze, R., Falkenburg, J. H. F. (1997). The role of cytokines and hematopoietic growth factors in the autocrine/paracrine regulation of inducible hematopoiesis. *Ann Hematol.* **75**: 27-31.

Connelly, D. (2015). A decade of smoking cessation in Europe. *Pharm J.* **294**.

Contoli, M., Ito, K., Padovani, A., Poletti, D., Marku, B., Edwards, M. R., Stanciu, L. A., Gnesini, G., Pastore, A., Spanevello, A., Morelli, P., Johnston, S. L., Caramori, G., Papi, A. (2015). Th2 cytokines impair innate immune responses to rhinovirus in respiratory epithelial cells. *Allergy.* **70**: 910-920.

- Copenhaver, C. C., Gern, J. E., Li, Z., Shult, P. A., Rosenthal, L. A., Mikus, L. D., Kirk, C. J., Roberg, K. A., Anderson, E. L., Tisler, C. J., DaSilva, D. F., Hiemke, H. J., Gentile, K., Gangnon, R. E., Lemanske, R. F. Jr. (2004). Cytokine response patterns, exposure to viruses, and respiratory infections in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med.* **170**: 175-180.
- Cowland, J. B., Johnsen, A. H., Borregaard, N. (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* **368**: 173-176.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* **33**: 375-386.
- Dexter, T. M., Allen, T. D., Scott, D., Teich, N. M. (1979). Isolation and characterisation of a bipotential haematopoietic cell line. *Nature.* **277**: 471-474.
- Doll, R., Hill, A. B. (1950). Smoking and carcinoma of the lung. *Br Med J.* **2**: 739-748.
- Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L., Rosenberg, H. F. (1998). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3358-3363.
- Durrani, S. R., Montville, D. J., Pratt, A. S., Sahu, S., DeVries, M. K., Rajamanickam, V., Gangnon, R. E., Gill, M. A., Gern, J. E., Lemanske, R. F. Jr., Jackson, D. J. (2012). Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol.* **130**: 489-495.
- Dvorak, A. M., Lett-Brown, M., Thuesen, D., Grant, J. A. (1981). Complement-induced degranulation of human basophils. *J Immunol.* **126**: 523-528.
- Eggo, R. M., Scott, J. G., Galvani, A. P., Meyers, L. A. (2016). Respiratory virus transmission dynamics determine timing of asthma exacerbation peaks: Evidence from a population-level model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**: 2194-2199.
- El-Nawawy, A., Soliman, A. T., El-Azzouni, O., Amer, E. S., Demian, S., El-Sayed, M. (1996). Effect of passive smoking on frequency of respiratory illnesses and serum immunoglobulin-E (IgE) and interleukin-4 (IL-4) concentrations in exposed children. *J Trop Pediatr.* **42**: 166-169.
- Feleszko, W., Zawadzka-Krajewska, A., Matysiak, K., Lewandowska, D., Peradzyńska, J., Dinh, Q. T., Hamelmann, E., Groneberg, D. A., Kulus, M. (2006). Parental tobacco smoking is associated with augmented IL-13 secretion in children with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **117**: 97-102.
- Fireman, P. (2003). Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* **24**: 79-83.
- Gant, V., Cluzel, M., Shakoob, Z., Rees, P. J., Lee, T. H., Hamblin, A. S. (1992). Alveolar macrophage accessory cell function in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* **146**: 900-904.

- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K.** (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. **327**: 656-661.
- Gergen, P. J., Fowler, J. A., Maurer, K. R., Davis, W. W., Overpeck, M. D.** (1998). The burden of environmental tobacco smoke exposure on the respiratory health of children 2 months through 5 years of age in the United States: Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Pediatrics*. **101**: 1-8.
- Gern, J. E., Brooks, G. D., Meyer, P., Chang, A., Shen, K., Evans, M. D., Tisler, C., Dasilva, D., Roberg, K. A., Mikus, L. D., Rosenthal, L. A., Kirk, C. J., Shult, P. A., Bhattacharya, A., Li, Z., Gangnon, R., Lemanske, R. F. Jr.** (2006). Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. **117**: 72-78.
- Gilliland, F. D., Berhane, K., McConnell, R., Gauderman, W. J., Vora, H., Rappaport, E. B., Avol, E., Peters, J. M.** (2000). Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. *Thorax*. **55**: 271-276.
- Guerra, S., Lohman, I. C., Halonen, M., Martinez, F. D., Wright, A. L.** (2004). Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age. *Am J Respir Crit Care Med*. **169**: 70-76.
- Guo, J. T., Sohn, J. A., Zhu, Q., Seeger, C.** (2004). Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology*. **325**: 71-81.
- Håberg, S. E., Stigum, H., Nystad, W., Nafstad, P.** (2007). Effects of pre- and postnatal exposure to parental smoking on early childhood respiratory health. *Am J Epidemiol*. **166**: 679-686.
- Hamann, K. J., Barker, R. L., Loegering, D. A., Gleich, G. J.** (1987). Comparative toxicity of purified human eosinophil granule proteins for newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *J Parasitol*. **73**: 523-529.
- Hamann, K. J., Gleich, G. J., Checkel, J. L., Loegering, D. A., McCall, J. W., Barker, R. L.** (1990). *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol*. **144**: 3166-3173.
- Henderson, W. R., Jong, E. C., Klebanoff, S. J.** (1980). Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. *J Immunol*. **124**: 1383-1388.
- Henderson, W. R., Jörg, A., Klebanoff, S. J.** (1982). Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B₄, C₄, and D₄. *J Immunol*. **128**: 2609-2613.
- Hoekstra, M. O., Hovenga, H., Gerritsen, J., Kauffman, H. F.** (1996). Eosinophils and eosinophil-derived proteins in children with moderate asthma. *Eur Respir J*. **9**: 2231-2235.
- Isaacs, D., Clarke, J. R., Tyrrell, D. A., Webster, A. D., Valman, H. B.** (1981). Deficient production of leucocyte interferon (interferon- α) in vitro and in vivo in children with recurrent respiratory tract infections. *Lancet*. **2**: 950-952.

- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., Weiss, U.** (1991). Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. **354**: 389-392.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.** (2001). Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th edition. *New York: Garland Science*.
- Joiner, K. A., Ganz, T., Albert, J., Rotrosen, D.** (1989). *J Cell Biol*. **109**: 2771-2782.
- Julge, K., Vasar, M., Björkstén, B.** (2001). Development of allergy and IgE antibodies during the first five years of life in estonian children. *Clin Exp Allergy*. **31**: 1854-1861.
- Kang, T., Yi, J., Guo, A., Wang, X., Overall, C. M., Jiang, W., Elde, R., Borregaard, N., Pei, D.** (2001). Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem*. **276**: 21960-21968.
- Karakoc, F., Remes, S. T., Martinez, F. D., Wright, A. L.** (2002). The association between persistent eosinophilia and asthma in childhood is independent of atopic status. *Clin Exp Allergy*. **32**: 51-56.
- Karta, M. R., Gavala, M. L., Curran, C. S., Wickert, L. E., Keely, P. J., Gern, J. E., Bertics, P. J.** (2014). LPS modulates rhinovirus-induced chemokine secretion in monocytes and macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **51**: 125-134.
- Karvonen, A. M., Hyvärinen, A., Korppi, M., Haverinen-Shaughnessy, U., Renz, H., Pfefferle, P. I., Remes, S., Genuneit, J., Pekkanen, J.** (2015). Moisture damage and asthma: a birth cohort study. *Pediatrics*. **135**: 598-606.
- Khan, M. M.** (2008). Role of cytokines. *Immunopharmacology*. **XIV**: p. 266.
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.** (1975). „Natural“ killer cells in the mouse I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. **5**: 112-117.
- Kjeldsen, L., Bjerrum, O. W., Askaa, J., Borregaard, N.** (1992). Subcellular localisation and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem J*. **287**: 603-610.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengeløv, H., Borregaard, N.** (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. **268**: 10425-10432.
- Kloepfer, K. M., Lee, W. M., Pappas, T. E., Kang, T. J., Wirtis, R. F., Evans, M. D., Gangnon, R. E., Bochkov, Y. A., Jackson, D. J., Lemanske, R. F. Jr., Gern, J. E.** (2014). Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. **133**: 1301-1307.
- Krähenbühl, O., Rey, C., Jenne, D., Lanzavecchia, A., Groscurth, P., Carrel, S., Tschopp, J.** (1988). Characterization of granzymes A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. **141**: 3471-3477.

- Lapin, B., Piorkowski, J., Ownby, D., Freels, S., Chavez, N., Hernandez, E., Wagner-Cassanova, C., Pelzel, D., Vergara, C., Persky, V.** (2015). Relationship between prenatal antibiotic use and asthma in at-risk children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **114**: 203-207.
- Larsen, J. M., Brix, S., Thyssen, A. H., Birch, S., Rasmussen, M. A., Bisgaard, H.** (2014). Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants. *J Allergy Clin Immunol.* **133**: 1008-1013.
- Lehrer, R. I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K. J., Gleich, G. J.** (1989). Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol.* **142**: 4428-4434.
- Lewis, S. A., Pavord, I. D., Stringer, J. R., Knox, A. J., Weiss, S. T., Britton, J. R.** (2001). The relation between peripheral blood leukocyte counts and respiratory symptoms, atopy, lung function, and airway responsiveness in adults. *Chest.* **119**: 105-114.
- Linnamaa, P., Nieminen, K., Koulu, L., Tuomasjukka, S., Kallio, H., Yang, B., Tahvonen, R., Savolainen, J.** (2012). Pro-inflammatory and Th2-type cytokine responses in PBMC in infants are associated with parental smoking. *Clin Exp Allergy.* **42**: 1472-1478.
- Linneberg, A., Simonsen, J. B., Petersen, J., Stensballe, L. G., Benn, C. S.** (2006). Differential effects of risk factors of infant wheeze and atopic dermatitis emphasize a different etiology. *J Allergy Clin Immunol.* **117**: 184-189.
- Lister, S. M., Jorm, L. R.** (1998). Parental smoking and respiratory illnesses in Australian children aged 0-4 years: ABS 1989-90 National Health Survey results. *Aust N Z J Public Health.* **22**: 781-786.
- Machura, E., Mazur, B., Rusek-Zychma, M., Barć-Czarnecka, M.** (2010). Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clin Dev Immunol.* **2010**: 1-12.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., Porgador, A.** (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* **409**: 1055-1060.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., Schonke, E.** (1969). Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* **130**: 643-658.
- Masson, D., Tschopp, J.** (1985). Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem.* **260**: 9069-9072.
- McCarthy, D. A., Macey, M. G.** (2001). Cytometric analysis and function. *Cambridge University Press.* p. 416.
- McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venges, P., Kay, A. B.** (1981). Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite Immunol.* **3**: 359-373.

- Miller, J. F. A. P., Osoba, D.** (1967). Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev.* **47**: 437-520.
- Mitchell, H. M., Inglis, H., Simpson, H.** (1976). Viral infection in wheezy bronchitis and asthma in children. *Arch Dis Child.* **51**: 707-711.
- Mitchell, E. A., Beasley, R., Keil, U., Montefort, S., Odhiambo, J., ISAAC Phase Three Study Group.** (2012). The association between tobacco and the risk of asthma, rhinoconjunctivitis and eczema in children and adolescents: analyses from Phase Three of the ISAAC programme. *Thorax.* **67**: 941-949.
- Mollinedo, F., Nakajima, M., Llorens, A., Barbosa, E., Callejo, S., Gajate, C., Fabra, A.** (1997). Major co-localisation of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J.* **327**: 917-923.
- Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A., Gleich, G. J.** (1989). Toxicity of eosinophil cationic proteins gor guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am Rev Respir Dis.* **139**: 801-805.
- Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., Minegishi, Y., Yonekawa, H., Karasuyama, H.** (2005). Basophils play critical role in the development of IgE-mediated chronic allergik inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity.* **23**: 191-202.
- Murray, C. S., Woodcock, A., Smillie, F. I., Cain, G., Kissen, P., Custovic, A., NACMAAS Study Group.** (2004). Tobacco smoke exposure, wheeze, and atopy. *Pediatr Pulmonol.* **37**: 492-498.
- Noakes, P. S., Holt, P. G., Prescott, S. L.** (2003). Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses. *Allergy.* **58**: 1053-1058.
- Noakes, P. S., Hale, J., Thomas, R., Lane, C., Devadason, S. G., Prescott, S. L.** (2006). Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur Respir J.* **28**: 721-729.
- Norn, S., Jensen, C., Dahl, B. T., Stahl Skov, P., Baek, L., Permin, H., Jarløv, J. O., Sørensen, H.** (1986). Endotoxins release histamine by complement activation and potentiate bacteria-induced histamine release. *Agents Actions.* **18**: 149-152.
- Office on smoking and health (US).** (2006). The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the surgeon general. *Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.* p. 727.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, b.** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* **282**: 2085-2088.

- Préfontaine, D., Banville-Langelier, A. A., Fiset, P. O., Guay, J., An, J., Mazer, M., Hamid, Q., Mazer, B. D.** (2010). Children with atopic histories exhibit impaired lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor-4 signalling in peripheral monocytes. *Clin Exp Allergy*. **40**: 1648-1657.
- Quah, P. L., Kuo, I. C., Huang, C. H., Shek, L. P., Lee, B. W., Chua, K. Y.** (2011). Early onset wheeze associated with enhanced combined IL-1 β , IL-6, and IL-12/IL-23p40 in LPS-stimulated cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Allergy*. **41**: 970-978.
- Qureshi, S. T., Larivière, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., Malo, D.** (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*. **189**: 615-625.
- Randolph, G. J., Jakubzick, C., Qu, C.** (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*. **20**: 52-60.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., Kay, A. B.** (1992). Predominant Th2-like bronchoalveolar t-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. **326**: 298-304.
- Ronchetti, R., Marci, F., Ciofetta, G., Indinnimeo, L., Cutrere, R., Bonci, E., Antognoni, G., Martinez, F. D.** (1990). Increased serum IgE and increased prevalence of eosinophilia in 9-year-old children of smoking parents. *J Allergy Clin Immunol*. **86**: 400-407.
- Rosenberg, H. F.** (1995). Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J Biol Chem*. **270**: 7876-7881.
- Saladin, K. S.** (2012). Anatomy and physiology: the unity of form and function (6 ed.). *New York: McGraw Hill*.
- Schick, S., Glantz, S.** (2005). Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tobacco Control*. **14**: 396-404.
- Schvartsman, C., Farhat, S. C. L., Schvartsman, S., Saldiva, P. H. N.** (2013). Parental smoking patterns and their association with wheezing in children. *Clinics*. **68**: 934-939.
- Shevach, E. M.** (2001). Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med*. **193**: 41-46.
- Shi, H. Z., Xie, Z. F., Denq, J. M., Chen, Y. Q., Xiao, C. Q.** (2004). Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax*. **59**: 870-875.
- Specht, S., Saeftel, M., Arndt, M., Endl, E., Dubben, B., Lee, N. A., Hoerauf, A.** (2006). Lack of eosinophil peroxidase or major Basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun*. **74**: 5236-5243.
- Sprague, W. S., Apetrei, C., Avery, A. C., Peskind, R. L., Vandewoude, S.** (2015). Large granular lymphocytes are universally increased in human, macaque, and feline lentiviral infection. *Vet Immunol Immunopathol*. **167**: 110-121.

- Stedman, R. L.** (1967). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.* **68**: 153-207.
- Stewart, G. J., Ritchie, W. G., Lynch, P. R.** (1974). Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Pathol.* **74**: 507-532.
- Sykes, A., Edwards, M. R., Macintyre, J., Del Rosario, A., Gielen, V., Haas, J., Kon, O. M., McHale, M., Johnston, S. L.** (2013). TLR3, TLR4 and TLRs7-9 induced interferons are not impaired in airway and blood cells in well controlled asthma. *PloS One.* **8**: 1-10.
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., Opperhuizen, A.** (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **8**: 613-628.
- Tebow, G., Sherill, D. L., Lohman, I. C., Stern, D. A., Wright, A. L., Martinez, F. D., Halonen, M., Guerra, S.** (2008). Effects of parental smoking on interferon γ production in children. *Pediatrics.* **121**: 1563-1569.
- Török-Vistai, T., Sfichi, M., Bojan, A., Pojoga, C.** (2013). Monoclonal B cell lymphocytosis in patients with hepatitis C virus infection: prevalence, demographic and laboratory correlations. *Revista Romana de Medicina de Laborator.* **21**: 209-215.
- Tovey, E. R., Stelzer-Braid, S., Toelle, B. G., Oliver, B. G., Reddel, H. K., Willenborg, C. M., Belessis, Y., Garden, F. L., Jaffe, A., Strachan, R., Eyles, D., Rawlinson, W. D., Marks, G. B.** (2015). Rhinoviruses significantly affect day-to-day respiratory symptoms of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **135**: 663-669.
- Tsai, C. H., Huang, J. H., Hwang, B. F., Lee, Y. L.** (2010). Household environmental tobacco smoke and risks of asthma, wheeze and bronchitic symptoms among children in Taiwan. *Respir Res.* **11**: 1-10.
- Valent, P.** (1994). The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* **94**: 1177-1183.
- van Furth, R., Cohn, A. Z.** (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* **128**: 415-435.
- Vasar, M., Julge, K., Björkstén, B.** (2000). Development of atopic sensitization and allergic diseases in early childhood. *Acta Paediatr.* **89**: 523-527.
- Vinke, J. G., KleinJan, A., Severijnen, L. W. F. M., Fokkens, W. J.** (1999). Passive smoking causes an „allergic“ cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* **51**: 73-81.
- Voor, T., Julge, K.** (2004). Atoopilise sensibiliseerumise ja allergiahaiguste kujunemine Eesti ning Rootsi väikelastel ja seda mõjutavad tegurid. *Eesti Arst.* **83**: 160-167.
- Voor, T.** (2005). Microorganisms in infancy and development of allergy: comparison of estonian and swedish children. *TÜ Väitekirj.*

- Wever-Hess, J., Kouwenberg, J. M., Duiverman, E. J., Hermans, J., Wever, A. M.** (1999). Prognostic characteristics of asthma diagnosis in early childhood in clinical practice. *Acta Paediatr.* **88**: 827-834.
- Young, B., Stewart, W., O'Dowd, G., Wheater, P. R.** (2011). Acute inflammation, healing and repair. Wheater's basic pathology: a text, atlas and review of histopathology, 5th ed. *Churchill Livingstone* **5**: 12-26.
- Zhang, J., Qian, Z., Kong, L., Zhou, L., Tan, L., Chapman, R. S.** (1999). Effects of air pollution on respiratory health of adults in three Chinese cities. *Arch Environ Health.* **54**: 373-381.
- Zhu, J., Message, S. D., Qiu, Y., Mallia, P., Keadze, T., Contoli, M., Ward, C. K., Barnathan, E. S., Mascelli, M. A., Kon, O. M., Papi, A., Stanciu, L. A., Jeffery, P. K., Johnston, S. L.** (2014). Airway inflammation and illness severity in response to experimental rhinovirus infection in asthma. *Chest.* **145**: 1219-1229.
- Zmuda, K., Neufotistos, D., Ts'ao, C. H.** (2000). Effects of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and heparinoid on thromboelastographic assay of blood coagulation. *Am J Clin Pathol.* **113**: 725-731.

Kasutatud veebiaadressid

- [1] <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/> (27.05.2016)
- [2] <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online2004/fr-icd.htm?gj40.htm> (27.05.2016)
- [3] <https://www.riigiteataja.ee/akt/903024> (27.05.2016)
- [4] https://www.sm.ee/sites/default/files/content-editors/eesmargid_ja_tegevused/Tervis/tubakas_2014.pdf (27.05.2016)

LISA 1

ALLERGOFOOD projektis laste vanematele saadetud küsimustik.

Küsimustik

Palun vastake järgnevatele küsimustele ning tõmmake sobivale vastusevariandile ring ümber. Vajadusel võib valida rohkem kui ühe sobiva vastusevariandi. Kui Te ei ole mõnes vastuses kindel, siis jätke see täitmata. Palun võtke eeltäidetud küsimustik kaasa visiidile, mille käigus arst-uuriija vaatab Teie täidetud küsimustiku üle ning vajadusel aitab täita puuduolevad vastused.

Perekonna üldandmed

1. Ema praegune vanus
2. Isa praegune vanus
3. Ema pikkus sentimeetrites
4. Ema kaal kilogrammides enne rasedust
5. Ema kaal kilogrammides vahetult enne sünnitust
6. Ema rahvus
 - eestlane
 - venelane
 - muu (nimetage)
7. Isa rahvus
 - eestlane
 - venelane
 - muu (nimetage)
8. Ema haridustase
 - põhiharidus
 - kesk- või keskeriharidus
 - rakenduslik kõrg- või kõrgharidus
9. Isa haridustase
 - põhiharidus
 - kesk- või keskeriharidus
 - rakenduslik kõrg- või kõrgharidus
10. Ema: mis ametikohtadel olete töötanud viimase 10 aasta jooksul?.....
.....
11. Isa: mis ametikohtadel olete töötanud viimase 10 aasta jooksul?
.....
12. Mitu last oli peres enne uuritava lapse sündi?

Elukeskkond

13. Teie lapse praegune elukoht (nimetage linn/vald/küla/tänav/maja number)
14. Teie elamu tüüp:
 - kortermaja
 - ridaelamu
 - eramaja
15. Maja on ehitatud:
 - betoonist
 - tellisest
 - puidust
 - kergkruusaplokkidest (fibo)
 - ei tea
16. Kas Teie kodus on gaasipliit?
 - ei
 - jah
17. Maja valmimise aasta
 - peale 2010
 - 2001 – 2010
 - 1991 – 2000
 - 1971 – 1990
 - 1961 – 1970
 - 1960 või varem
 - ei tea

18. Kuidas Teie maja köetakse?
- radiaatorid
 - vesi
 - elekter
 - põrandaküte
 - soojuspumbad
 - ahiküte
 - kivisüsi
 - puit
 - muu (nimetage)
19. Kas lapse magamistoa või elutoa akendele tekib talvel kondensvesi?
- ei
 - jah
20. Kas olete tundnud kodus kopituse lõhna?
- ei
 - jah
21. Kas kodus on nähtavat hallitust?
- ei
 - jah
22. Millal tegite kodus viimati remonti?
- > 3 aastat tagasi
 - 2–3 aastat tagasi
 - < 2 aastat tagasi
23. Elamispinna suurus (ruutmeetrites)m²
- Laste arv, kes elavad samal elamispinnal
- Täiskasvanute arv, kes elavad samal elamispinnal
- Leibkonna neto kuusissetulek (k.a. toetused, stipendiumid jms)
24. Mitmendal korrusel Te elate (juhul, kui Teil on mitu korrust, siis mitmendal korrusel asub lastetuba)?
25. Mitmekorruselises majas Te elate?
26. Kas lapse voodis on midagi järgnevast:
- sulepadi
 - suletekk
 - villane tekk
 - kaisuloom
27. Kui pikalt on kasutusel Teie lapse tekk?
- <1 aasta
 - 1-2 aastat
 - > 2 aastat
28. Kui pikalt on kasutusel Teie lapse padi?
- <1 aasta
 - 1-2 aastat
 - > 2 aastat
29. Mis põrandakate on Teie lapse toas?
- linoleum / PVC
 - puitparkett
 - laminaatparkett
 - vaip
 - muu (täpsustage)
30. Kas kodus on praegu lemmikloomi või on olnud viimase 3 a jooksul:
- ei
 - jah
 - Palun nimetage need loomad.....
 - Mis ajast või mis ajavahemikus?

31. Kas laps puutub mujal loomadega kokku?

- ei
- jah, mõni kord kuus (nimetage koduloom)
- jah, mõni kord nädalas (nimetage koduloom)
- jah, iga päev (nimetage koduloom)

32. Kas viimase kolme aasta jooksul on Teie elukoht muutunud?

- ei
- jah. Millal?.....

32.1 Teie **endine** elukoht (nimetage linn/vald/küla/tänav/maja number)

32.2 Teie **endise** elukoha elamutüüp

- kortermaja
- ridaelamu
- eramaja

32.3 Teie **endine** maja on ehitatud:

- betoonist
- tellistest
- puidust
- kergkruusaplokkidest (fibo)
- ei tea

32.4 Kas Teie **eelmises** kodus oli gaasipliit?

- ei
- jah

32.5 Eelmise kodumaja valmimise aasta

- peale 2010
- 2001 – 2010
- 1991 – 2000
- 1971 – 1990
- 1961 – 1970
- 1960 või varem

32.6 Kuidas köeti Teie endist maja?

- radiaatorid
 - vesi
 - elekter
- põrandaküte
- õhkpumbad
- ahiküte
 - kivisüsi
 - puit
- muu (nimetage)

32.7 Kas Teie eelmises elukohas lapse magamistoa või elutoa akendele tekkis talvel kondensvesi?

- ei
- jah

32.8 Kas eelmises elukohas olite tundnud kodus kopituse lõhna?

- ei
- jah

32.9 Kas Teie eelmises kodus oli nähtavat hallitust?

- ei
- jah

32.10 Millal tehti eelmises elukohas viimati remonti?

- > 3 aastat tagasi
- 2-3 aastat tagasi
- < 2 aastat tagasi

- 32.11 Teie eelmise elukoha elamispinna suurus (ruutmeetrites)m²
- 32.12 Laste arv, kes elasid samal elamispinnal
- 32.13 Täiskasvanute arv, kes elas samal elamispinnal
- 32.14 Mitmendal korrusel Te elasite (juhul, kui Teil oli mitu korrust, siis mitmendal korrusel asus lastetuba)?
- 32.15 Mitmekorruselises majas Te elasite?
- 32.16 Milline põrandakate oli Teie lapse toas?
- linoleum
 - puitparkett
 - laminaatparkett
 - vaip
 - muu (täpsustage)

33. Kas Teie laps käib lasteaias või lastehoius (sõim, päevahoid, erahoidja)?

- ei
- jah
 - Mitu tundi nädalas ta seal keskmiselt viibib?.....
 - Mitmendal elukuul hakkas laps lasteaias / -hoius käima?
 - Kui palju lapsi on lastehoiu rühmas?.....

34. Mitu tundi **ööpäevast** (24 h) viibib/viibis laps märgitud elukuudel keskmiselt siseruumides? Palun täitke allolev tabel.

elukuud	1. - 4.	5. - 8.	9. - 12.	13. - 16.	17. - 20.	21. - 24.	25. - 27.
tunde siseruumides ööpäevas							

35. Kas Teie laps on käinud välismaa-reisil?

- ei
- jah (nimetage palun riik ja reisi kestvus)

Allergilised ja hingamisteede haigused perekonnas

36. Kas Teie teistel lastel (k.a. uuritava lapse kasuõdedel/kasuvendadel) esineb / on esinenud allergilisi haigusi?

- ei
- jah, (alla kriipsutada) astma, allergiline nohu, heinapalavik, allergia ravimitele, toidutalumatus, toiduallergia, allergiline silmapõletik, anafülaktiline reaktsioon, nõgestõbi, allergiline nahapõletik, kontaktallergia, muud (palun nimetage)

Mis vanuses see esmaselt avaldus?

Nende ravi (palun nimetage ravimid):

Allergeenid, mis alati põhjustavad haiguse sümptomeid (palun nimetage allergeenid ja kirjutage sulgudesse, mis sümptomeid see põhjustab)

Nendest on tõestatud nahatorketestide või vereanalüüsiga

Nimetage allergeenid, mis on leitud nahatorketestide või vereanalüüsiga, kuid ei põhjusta sümptomeid.....

37. Kas Teie teistel lastel esineb / on esinenud hingamisteede haigusi?

- ei
- jah, (palun alla kriipsutada) astma, obstruktiivne bronhiit, sagedased bronhiidid, krooniline bronhiit, kopsupõletikud, krooniline köha, muud probleemid hingamisteede või kopsudega (palun nimetage).....

38. Kas lapse emal esineb allergilisi haigusi?

- ei,
- jah (palun alla kriipsutada) astma, allergiline nohu, heinapalavik, ravimallergia, toidutalumatus, toiduallergia, allergiline silmapõletik, anafülaktiline reaktsioon, nõgestõbi, allergiline nahapõletik, kontaktallergia, muud (nimetada):

Mis vanuses see esmaselt avaldus?

Nende ravi (palun nimetage ravimid)

Allergeenid, mis alati põhjustavad haiguse sümptomeid (palun nimetage allergeenid ja kirjutage sulgudesse, mis sümptomeid see põhjustab)

Nendest on tõestatud nahatorketestide või vereanalüüsiga

Nimetage allergeenid, mis on leitud nahatorketestide või vereanalüüsiga, kuid ei põhjusta sümptomeid

Mitu korda esines raseduse ajal allergilise haiguse ägenemist?

39. Kas lapse emal esineb hingamisteede haigusi?

- ei
 - jah, (palun alla kriipsutada) astma, obstruktiivne bronhiit, sagedased bronhiidid, krooniline bronhiit, kopsupõletikud, krooniline köha, muud probleemid hingamisteede või kopsudega (palun nimetage):
- Nende ravi (palun nimetage ravimid)
- Mitu korda esines raseduse ajal hingamisteede haiguste ägenemist?

40. Kas emapoolses suguvõsas (lapse ema õed, vennad ja vanemad) esineb allergilisi haigusi?

- ei
- jah (palun alla kriipsutada) astma, allergiline nohu, heinapalavik, ravimallergia, toidutalumatus, toiduallergia, allergiline silmapõletik, anafülaktiline reaktsioon, nõgestõbi, allergiline nahapõletik, kontaktallergia, muud (nimetada):

41. Kas lapse isal esineb allergilisi haigusi?

- ei
- jah, (palun alla kriipsutada) astma, allergiline nohu, heinapalavik, ravimallergia, toidutalumatus, toiduallergia, allergiline silmapõletik, anafülaktiline reaktsioon, nõgestõbi, allergiline nahapõletik, kontaktallergia, muud (nimetada):

Mis vanuses see esmaselt avaldus?

Nende ravi (palun nimetage ravimid)

Allergeenid, mis alati põhjustavad haiguse sümptomeid (palun nimetage allergeenid ja kirjutage sulgudesse, mis sümptomeid see põhjustab)

Nendest on tõestatud nahatorketestide või vereanalüüsiga

Nimetage allergeenid, mis on leitud nahatorketestide või vereanalüüsiga, kuid ei põhjusta sümptomeid.....

42. Kas lapse isal esineb hingamisteede haigusi?

- ei
 - jah, (palun alla kriipsutada) astma, obstruktiivne bronhiit, sagedased bronhiidid, krooniline bronhiit, kopsupõletikud, krooniline köha, muud probleemid hingamisteede või kopsudega (palun nimetada):
- Nende ravi (palun nimetada)

43. Kas isapoolses suguvõsas (lapse isa õed, vennad ja vanemad) esineb allergilisi haigusi?

- ei
- jah (palun alla kriipsutada) astma, allergiline nohu, heinapalavik, ravimallergia, toidutalumatus, allergiline silmapõletik, anafülaktiline reaktsioon, nõgestõbi, allergiline nahapõletik, kontaktallergia, muud (nimetada):

Rasedus ja sünnitus

44. Raseduse pikkus (nädalates)?.....

45. Kas raseduse ajal esines ägedaid haigestumisi (k.a. tavaline külmetus, bronhiit, kopsupõletik, tsüstiit (põiepõletik)?

- ei
- jah. Palun nimetage haigus ja tarvitatud ravimid:

haigus	trimester haigestumisel	tarvitatud ravimid

46. Kas raseduse ajal esines Teil mõni **kroonilise** haiguse (haigus, mis kestab vähemalt 3 kuud ja mida ei saa vältida vaksineerimisega ega välja ravida sh suhkrutõbi, reumatoidartriit, kõrgvererõhu tõbi, kilpnäärme haigus, Crohn-i tõbi, haavandiline koliit) **ägenemine**?

- ei
- jah. Palun nimetage haigus ja tarvitatud ravimid:

haigus	trimester ägenemisel	tarvitatud ravimid

47. Kas raseduse ajal esines rasedustoksikoos?

- ei
- I trimestril
- II trimestril
- III trimestril

48. Kas raseduse ajal esines katkemisohtu?

- ei
- I trimestril
- II trimestril
- III trimestril

49. Kas vajasite rasedust säilitavat ravi?

- ei
- jah. Palun nimetage ravimid:

50. Sünnituse viis

- sünnitasite ise (vaginaalne sünnitus)
- laps sündis keisrilõike teel

51. Kus Te sünnitasite?

- haiglas
- kodus
- mujal

52. Kui kaua viibisite sünnitusmajas pärast lapse sündi?

- < 24 tundi
- 24 – 48 tundi
- 49 – 72 tundi
- > 3 päeva

53. Kas viibisite haiglas kauem kui 48 tundi?

- ei
- jah, enda tervise pärast
- jah, lapse tervisliku seisundi pärast.
- jah, muudel põhjustel.

Teie laps

54. Lapse sugu

- poiss
- tüdruk

55. Lapse sünnikuupäev

56. Lapse sünnikaal

57. Lapse sünnipikkus

58. Vastsündinu peaümbermõõt

59. Apgari skoor

60. Lapse praegune pikkus sentimeetrites:

61. Lapse praegune kehakaal kilogrammides:

LAPSE TOIT

62. Kas laps sai rinnapiima?

- ei
- jah, mis vanuseni?

63. Kas jöite raseduse ja rinnaga toitmise ajal piima?

- üldse mitte
- ≤1 klaas päevas
- 2 - 3 klaasi päevas
- ≥ 4 klaasi päevas

64. Kas laps sai piimasegu?

- ei
- kui jah, siis millist piimasegu laps sai
 - poepiimasegu, (palun nimetada)
 - apteegipiimasegu, (palun nimetada)

Laps sai piimasegu alates elukuust

Laps sai piimasegu vanuseni..... elukuud

65. Kas laps saab lehmapiima?

- ei
- jah, pastöriseeritud
- jah, pastöriseerimata

66. Kui laps saab lehmapiima, kas Te seda lahjendate/lahjendasite?

- ei
- jah, lahjendan veega
- jah, lahjendan tummiga

67. Mis vanusest hakkas laps saama

- mahla ja/või smuutisid?
- putru.....
- püreesid (k.a aedviljapüree, marja- ja puuviljapüree)
- saia, leiva, küpsised

68. Kas Teie laps on söönud valget kala?

- ei, mitte kunagi
- jah
 - harvem kui kord nädalas
 - umbes kord nädalas
 - 2–3 korda nädalas
 - praktiliselt iga päev

69. Kas Teie laps on söönud punast kala?

- ei, mitte kunagi
- jah
 - harvem, kui kord nädalas
 - umbes kord nädalas
 - 2-3 korda nädalas
 - praktiliselt iga päev

70. Kas Teie laps on saanud kalamaksaõli

- ei, mitte kunagi
- jah. Mis preparaati ja mitu ravikuuri?

71. Mis vanusest hakkas laps saama järgnevaid lisatoite ja kas need on põhjustanud mingeid tervisehäireid? Palun täitke allolev tabel:

Toiduaine nimi	Vanus (elukuudes), millal laps sai toitu esimest korda. Märkige „–“, kui laps pole seda veel söönud.	Reaktsiooni esinemise korral kirjeldage seda ja kirjutage, mitu korda antud reaktsioon oli esinenud (nt lööve 2 korda, kõhulahtisus 5 korda jne)	Mis vanuses (elukuudes) antud reaktsioon esines esimest korda?	Mis vanusest (elukuudes) laps seda toitu talub?
piim				
laktoosivaba piim				
muna				
kartul				
lillkapsas				
kapsas				

Toiduaine nimi	Vanus (elukuudes), millal laps sai toitu esimest korda. Märkige „–“, kui laps pole seda veel söönud.	Reaktsiooni esinemise korral kirjeldage seda ja kirjutage, mitu korda antud reaktsioon oli esinenud (nt lööve 2 korda, kõhulahtisus 5 korda jne)	Mis vanuses (elukuudes) antud reaktsioon esines esimest korda?	Mis vanusest (elukuudes) laps seda toitu talub?
kõrvits				
porgand				
spinat				
peet				
hiinakapsas				
kaer				
hirss				
tatar				
mais				
riis				
nisujahu ja jahutooted (k.a sai, küpsised, makaronid)				
rukis				
oder				
õun				
pirn				
ploom				
kreegid				
banaan				
maasikas				
vaarikas				
mustikas				
metsmaasikas				
murakas				
pohl				
jõhvikas				
karumari				
must sõstar				
punane sõstar				
valge sõstar				
kirss				
virsik				
aprikoos				
ananass				
kiivi				
apelsin				
greip				
mandariin				
sidrun				
avokaado				
mesi				
šokolaad				
muud maiustused				
mandel				
sarapuupähkel				
maapähkel				
muud pähklid				
hernes, oad ja aeduba				

Toiduaine nimi	Vanus(elukuudes), millal laps sai toitu esimest korda. Märkige „–“, kui laps pole seda veel söönud.	Reaktsiooni esinemise korral kirjeldage seda ja kirjutage, mitu korda antud reaktsioon oli esinenud (nt lööve 2 korda, kõhulahtisus 5 korda jne)	Mis vanuses (elukuudes) antud reaktsioon esines esimest korda?	Mis vanusest (elukuudes) laps seda toitu talub?
seemned				
paprika				
tomat				
jogurt				
hapukoor				
hapupiim				
keefir				
kohupiim (sh kodujuust)				
juust				
või				
toiduõli				
margarin				
soja (k.a vorstid, sardellid, viinerid jms)				
sealiha				
kanaliha				
kalkuniliha				
küülikuliha				
veise- ja loomaliha				
lambaliha				
maks, sh maksakaste ja pasteet				
punane kala				
valge kala				
koorikloomad (s.h. krevetid)				
muu (palun nimetada)				
.....				
.....				

LAPSE ÜLDINE TERVIS

72. Kas laps on käinud arsti juures rohkem kui tavakontrollis või seoses vaktsineerimisega?

- ei
- jah. Miks?.....

73. Kas Teie lapsel on diagnoositud mingeid haigusi?

- ei
- jah. Milliseid?.....

74. Kas laps on tarvitanud mingeid ravimeid ?

- ei
- jah
 - paratsetamooli (k.a. Coldrex ja paratsetamooli küünlad)
 - ei
 - jah
 esimese eluaasta jooksul korda
 teise eluaasta jooksul korda
 - antibiootikume
 - ei
 - jah (palun täitke allolev tabel)

antibiootikumi nimi	haigus, mille tõttu oli antud antibiootikum väljakirjutatud	Mis vanuses (elukuudes) laps seda sai?

antibiootikumi nimi	haigus, mille tõttu oli antud antibiootikum väljakirjutatud	Mis vanuses (elukuudes) laps seda sai?

- muu (palun minetage)

75. Kas Teie lapsel esineb talumatus mõne ravimi vastu?

- ei
- jah. Millise ravimi vastu ja milles seeväljendub?.....

76. Kas laps on saanud D-vitamiini?

- ei
- jah. Palun kriipsutage alla preparaadi nimetus Apovit / Devitol / Jekovit / muu.....

77. Kas laps on saanud probiootikume (piimhappebakterite preparaate)?

- ei
 - jah
-ravikuuri vanuselt (elukuudes)

78. Kas Teie last on vaktsineeritud?

- ei
- jah. Laps sai kõik vaktsiinid, mis on ette nähtud Eesti vaktsineerimiskalendriga.
- jah. Laps on vaktsineeritud, kuid ei ole Eesti vaktsineerimiskalendriga ette nähtud vaktsiinidest saanud järgnevaid (palun nimetage vaktsiini nimi ja põhjus, miks laps ei saanud seda vaktsiini)

Kui laps sai plaaniväliseid vaktsiine, palun nimetage need

Suitsetamine ja tubakasuitsuga kokkupuude

79. Kas ema suitsetas enne rasedust?

- ei
- jah.
 - Mitu sigaretti päevas? Mitme aasta kestel?
 - Kui suitsetamine on maha jäetud, siis millal

80. Kas ema suitsetas raseduse ajal?

- ei
- jah. Mitu sigaretti päevas?.....

81. Kas ema suitsetas rinnaga toitmise ajal?

- ei
- jah. Mitu sigaretti päevas?.....

82. Kas raseduse ajal viibisite ruumides, kus esines tubakasuitsu?

- ei
- jah, harvem kui kord nädalas
- jah, sagedamini kui kord nädalas, aga mitte iga päev
- jah, igapäevaliselt

83. Kas rinnaga toitmise ajal viibisite ruumides, kus esines tubakasuitsu?

- ei
- jah, harvem kui kord nädalas
- jah, sagedamini kui kord nädalas, aga mitte iga päev
- jah, igapäevaliselt

84. Kas lapse isa suitsetab / varem suitsetas?

- ei
- jah, ta suitsetas varemsigaretti päevasaasta jooksul; jättis suitsetamise mahaaastal
- jah, ta suitsetab sigaretti päevas..... aasta jooksul
- ei tea

85. Kas laps viibib / on viibinud elu jooksul ruumides, kus esines tubakasuitsu?

- ei
- jah
 - harvem kui kord nädalas
 - sagedamini kui kord nädalas, aga mitte iga päev
 - igapäevaselt

TÄNAME TEID KOOSTÖÖ EEST!



Euroopa Liidu
struktuuritoetus



Eesti tuleviku heaks

Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut, Nooruse 1, 50411 Tartu, Tartumaa, Eesti Vabariik,
allergofood@ut.ee

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Anastassia Lenskaja _____

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 28.01.1992 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

_____ Passiivse suitsetamise mõju astma kujunemisele väikelastel _____,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on _____ Berit Pilden-Sarv, Renata Melnikova ja Svetlana Sergejeva _____,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ 27.05.2016 _____ (*kuupäev*)